

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im
Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. C. Klein

**Regulation, Funktion und Interaktionsmuster der Splicevariante PEX19 Δ 2:
Komplexe Regulierungsmechanismen der frühen peroxisomalen Biogenese**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Clemens Rudolf von Beckerath
aus München

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Ania C. Muntau

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Susanna Hofmann
Prof. Dr. Ortrud Steinlein

Betreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Amelie S. Lotz-Havla

Dekan: Prof. Dr. med. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 02.10.2014

| | |
|--|----|
| | I |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Von der DNA zum Protein - RNA-Splicing und Translation | 1 |
| 1.1.1 Organisation eukaryotischer DNA: Introns und Exons | 1 |
| 1.1.2 Transkription und RNA-Splicing | 1 |
| 1.1.3 Translation | 2 |
| 1.1.4 Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) | 2 |
| 1.2 PEX19: Essentielles Protein der peroxisomalen Biogenese | 4 |
| 1.2.1 Das Peroxisom | 4 |
| 1.2.2 Peroxisomale Stoffwechselkrankheiten | 6 |
| 1.2.3 Peroxisomale Biogenese | 9 |
| 1.2.4 Genetische Organisation und molekulare Charakterisierung von <i>PEX19</i> | 12 |
| 1.3 Zielsetzung | 15 |
| 2 Material und Methoden | 17 |
| 2.1 RNA-Isolierung und Reverse Transkription | 17 |
| 2.1.1 RNA-Isolierung aus Gewebeproben | 17 |
| 2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Ultraviolett Absorptionsspektrometrie | 18 |
| 2.1.3 Reverse Transkription | 18 |
| 2.2 Etablierung einer Real-Time-quantitativen RT-PCR-Methode zur quantitativen Bestimmung der Splicevarianten | 19 |
| 2.2.1 Bestimmung spezifischer Primerpaare | 20 |
| 2.2.2 Real-Time PCR | 22 |
| 2.2.3 Absolute Quantifizierung | 23 |
| 2.2.4 Relative Quantifizierung | 24 |
| 2.2.5 Klonierung der Plasmid-DNA für die Verdünnungsreihen | 25 |
| 2.3 Bestimmung von NMD | 29 |
| 2.3.1 Hemmung der Proteinsynthese <i>in vivo</i> | 29 |
| 2.3.2 Translationbestimmung durch S ^[35] -Markierung und Bestimmung der Radioaktivität | 30 |
| 2.3.3 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford | 30 |
| 2.4 Detektion von Protein-Protein-Interaktionen <i>in vivo</i> mittels BRET | 31 |
| 2.4.1 Gateway®-Klonierung | 32 |
| 2.4.2 Zellkultur und Transfektion | 37 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.4.3 | Detektion des BRET-Signals | 38 |
| 2.4.4 | Berechnung der BRET-Ratio | 39 |
| 3 | Ergebnisse | 40 |
| 3.1 | Quantifizierung der Splicevarianten PEX19 und PEX19 Δ 2 mittels Real-Time RT-PCR | 40 |
| 3.1.1 | Überprüfung der Spezifität der Primerpaare | 40 |
| 3.1.2 | Effizienz der Real-Time PCR | 43 |
| 3.1.3 | Absolute Quantifizierung aus <i>human first strand</i> cDNA | 44 |
| 3.1.4 | Absolute Quantifizierung aus Gewebeprobe | 47 |
| 3.2 | Untersuchung der Regulierung von PEX19 Δ 2 mittels NMD | 49 |
| 3.2.1 | Translationshemmung mit Puromycin | 50 |
| 3.2.2 | Translationshemmung mit Cycloheximid | 51 |
| 3.3 | Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen von PEX19 und PEX19 Δ 2 mittels BRET | 53 |
| 3.3.1 | Interaktionen des Volllänge-PEX19-Proteins mit peroxisomalen Membranproteinen | 54 |
| 3.3.2 | Interaktionen der Splicevariante PEX19 Δ 2 mit peroxisomalen Membranproteinen | 55 |
| 4 | Diskussion | 56 |
| 4.1 | Quantifizierung der Splicevarianten | 56 |
| 4.2 | Regulierung durch NMD | 57 |
| 4.3 | Bestimmung der Protein-Protein-Interaktion mittels BRET | 59 |
| 4.4 | Diskussion der Methoden | 60 |
| 5 | Zusammenfassung | 64 |
| 6 | Abkürzungsverzeichnis | 66 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 68 |
| 8 | Danksagung | 75 |

1 Einleitung

1.1 Von der DNA zum Protein - RNA-Splicing und Translation

1.1.1 Organisation eukaryotischer DNA: Introns und Exons

Die für die Aufrechterhaltung der Funktion einer Zelle benötigte Information ist in Form von Basenpaaren auf dem DNA-Doppelstrang enthalten. Ein Triplet der Purinbasen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin bilden dabei den spezifischen Code für die jeweiligen Aminosäuren. Aus diesen entstehen die Proteine, welche die funktionellen Bausteine jeglicher biochemischer Reaktionen sind.

Am Anfang des Informationsflusses steht die Transkription vom DNA-Matrizenstrang zum einzelsträngigen RNA-Molekül durch die RNA-Polymerase. Diese bindet an den zu transkribierenden DNA-Abschnitt durch Transkriptionsfaktoren, welche den Initiator-Komplex bilden. Dann erst folgt die Translation der RNA zum Protein.

Eine der Hauptcharakteristika eukaryotischer DNA ist die Organisation in Introns und Exons. Introns sind die nicht codierenden Abschnitte eines Gens, Exons die codierenden. Die Exons eines Gens codieren mit ihrer Basenabfolge jeweils für ein spezifisches Protein.

1.1.2 Transkription und RNA-Splicing

DNA kann nicht aus dem Zellkern ins Zytosol transportiert werden. Hierzu muss die Information zunächst in mRNA umgeschrieben werden. Diese kann im Zytosol in funktionelle Proteine übersetzt werden.

Die Introns eines DNA-Doppelstrangs müssen nach der Transkription aus dem prä-mRNA-Strang entfernt werden. Dieser enzymatische Schneidevorgang heißt „Splicing“. Durch das Splicing können mRNA-Einzelstränge unterschiedlicher Länge entstehen, die Splicevarianten. Die Erklärung hierfür liegt darin, dass die Exons nach Entfernung der Introns in unterschiedlicher Anordnung wieder zusammengesetzt werden können. Über ein Drittel der menschlichen Gene haben mehrere Splicevarianten, wodurch aus nur einem prä-mRNA-Strang mehrere mRNA-Moleküle und damit verschiedene Proteine aus ein und demselben Gen gebildet werden können (*Brett 2000*). Dies ermöglicht eine Vielzahl posttranskriptioneller Regulierungsmechanismen (*Nilsen 2010, Zheng 2013*).

1.1.3 Translation

Für die Proteinbiosynthese ist ein eigenes Organell notwendig, das Ribosom. Die verschiedenen Aminosäuren sind mit einem spezifischen Transfer-RNA-Molekül (tRNA) verbunden, welches an das jeweilige Triplet des mRNA-Einzelstrangs bindet. Es entsteht so auf lineare Weise eine Kette von Aminosäuren, die sich in Abhängigkeit vieler Faktoren, wie dem Anteil hydrophober und hydrophiler Aminosäuren, zu einem funktionellen Protein mit definierter dreidimensionaler Struktur faltet. Ein Startcodon (das Basentriplett AUG) signalisiert dabei den Anfang des zu übersetzenden mRNA-Einzelstrangs, ein Stopcodon (die Basentriplets UAG, UAA, UGA) dessen Ende. Zwischen der Transkription der DNA und einer möglichen Proteinsynthese liegen eine Vielzahl von Regulationsmechanismen, die die Aufgabe haben, die Genauigkeit der Genexpression auf verschiedenen Ebenen zu gewährleisten. Einer dieser Mechanismen wird als nonsense-mediated mRNA decay (NMD) bezeichnet.

1.1.4 Nonsense-mediated mRNA decay (NMD)

Bereits vor 30 Jahren wurde beobachtet, dass „nonsense“-Codons der *ura3* mRNA in *Saccharomyces cerevisiae* eine drastisch verringerte Halbwertszeit aufwiesen (Losson 1979). Gleiches zeigte sich für homozygote β^0 -Thalassaemie-Patienten, bei denen eine nonsense-Mutation auf dem β -Globulin-Gen vorlag (Maquat et al 1981). In beiden Fällen ist NMD für den beschleunigten Abbau der jeweiligen mRNA-Einzelstränge verantwortlich. Manche Autoren gehen davon aus, dass bei nahezu einem Viertel der vererbten, genetischen Störungen NMD eine Rolle spielt (Holbrook 2004).

Durch das Splicen können vorgezogene Stopcodons entstehen, sogenannte „Premature Termination Codons“ (PTC), wenn zum Beispiel das Leseraster verschoben wird („frame shift“). mRNA-Einzelstränge, die ein PTC enthalten, unterliegen in der Regel dem nonsense mediated mRNA-decay (NMD), wenn das PTC mindestens 50 Basenpaare vom 3'-Ende des Exons entfernt liegt (Nagy 1998). Von wesentlicher Bedeutung sind hierbei die „exon junction complexes“ (EJCs), die während der Prozessierung der prä-mRNA vom Spliceosom an die Stellen der entfernten Introns, also den Exon-Exon-Verbindungen, angebracht werden. Diese Proteine werden während der ersten Runde der Translation durch die Ribosomen vom mRNA-Einzelstrang entfernt. Bricht das Ribosom jedoch die Translation wegen des PTCs vorzeitig ab, bleibt ein Rest des mRNA-Einzelstrang mitsamt seiner EJCs übrig (Abbildung 1). Dieser mRNA-Einzelstrang

wird von schneidenden Enzymen („decapping enzymes“) erkannt und deutlich schneller abgebaut als Splicevarianten, die kein PTC enthalten (Ishigaki 2001; Lykke-Andersen 2000). Dieser Vorgang soll die Zelle vor potentiell schädlichen Proteinen schützen, die durch die neuen mRNA-Versionen codiert werden (Lewis, 2003; Green 2003; Nicholson et al 2009).

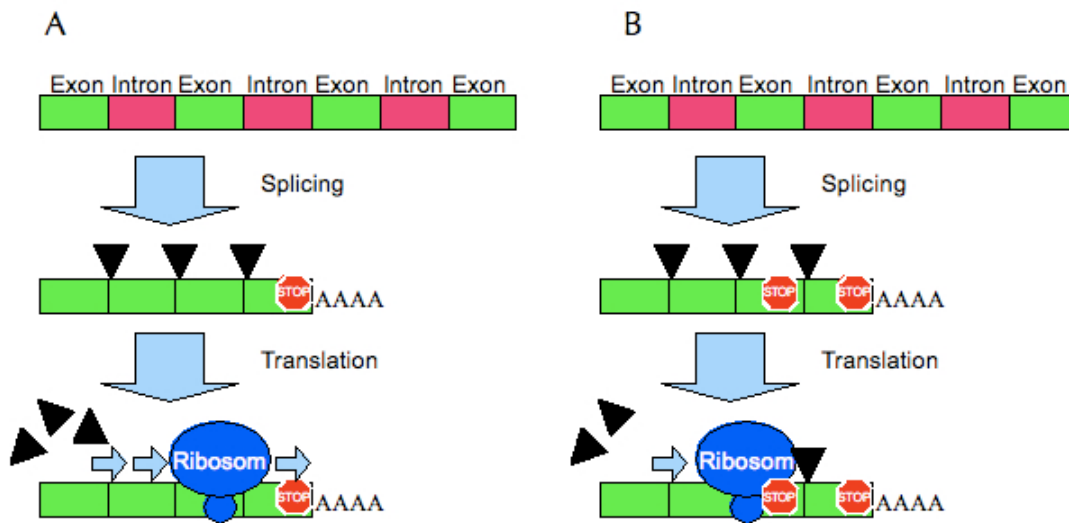


Abbildung 1 Nonsense-mediated mRNA decay (NMD). **(A)** Kein NMD an der Full-Length Variante. Das Ribosom liest den mRNA-Strang bis zum Stop-Codon (rotes Stoppschild) ab. Die EJs (schwarze Dreiecke), die vom Spliceosom am mRNA-Strang angebracht wurden, werden vom Ribosom wieder gelöst (Le Hir 2001). AAA= Poly-A-Schwanz. **(B)** NMD an der Splicevariante mit PTC. Das Ribosom liest den mRNA-Strang bis zum vorgezogenen, durch frame shift entstandenen Stop-Codon ab. Der verbleibende EJC markiert den Strang, das dann abgebaut wird.

Diese einfache Funktion, gewissermaßen die „Qualitätskontrolle“ und „Reinigung“ der Zelle von sinnlosen Genprodukten, scheint aus heutiger Sicht jedoch nicht der einzige Sinn von NMD zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass ein Drittel aller Splicevarianten, teilweise unabhängig von der Funktionstüchtigkeit der durch sie codierten Proteine, durch NMD reguliert werden (Green 2003, Wollerton 2004). Damit scheint klar, dass alternatives Splicing in Verbindung mit NMD ein wichtiger Weg zur translationsabhängigen, posttranskriptionalen Regulierung der Genexpression ist (Stalder 2008; Neu-Yilik 2004; Hillman 2004; Lewis 2003; Lamba 2003).

1.2 PEX19: Essentielles Protein der peroxisomalen Biogenese

1.2.1 Das Peroxisom

Alle eukaryontischen Zellen zeigen als charakteristische Eigenschaft eine Unterteilung in spezialisierte Kompartimente, die jeweils eine bestimmte Rolle in der Zellphysiologie spielen und meist durch eine eigene Lipidmembran umgeben sind. Eine dieser Organellen ist das Peroxisom. Peroxisomen sind Zellorganellen, die in allen Zellen außer reifen Erythrozyten und Spermien vorkommen (*Luers et al. 2006*). Ihre Größe bewegt sich abhängig vom jeweiligen Gewebe zwischen 0,5-1,0 μm Durchmesser in Leber und Niere bzw. 0,05-0,2 μm in Hefezellen (Abbildung 2) (*De Duve 1966*). Peroxisomen haben (im Gegensatz zu Mitochondrien) keine eigene DNA und sind nicht in der Lage, ihre spezifischen Enzyme und Proteine selber zu synthetisieren. Entstehung und Proteinimport sind daher von grundlegender Bedeutung, will man die Funktion der Peroxisomen verstehen.

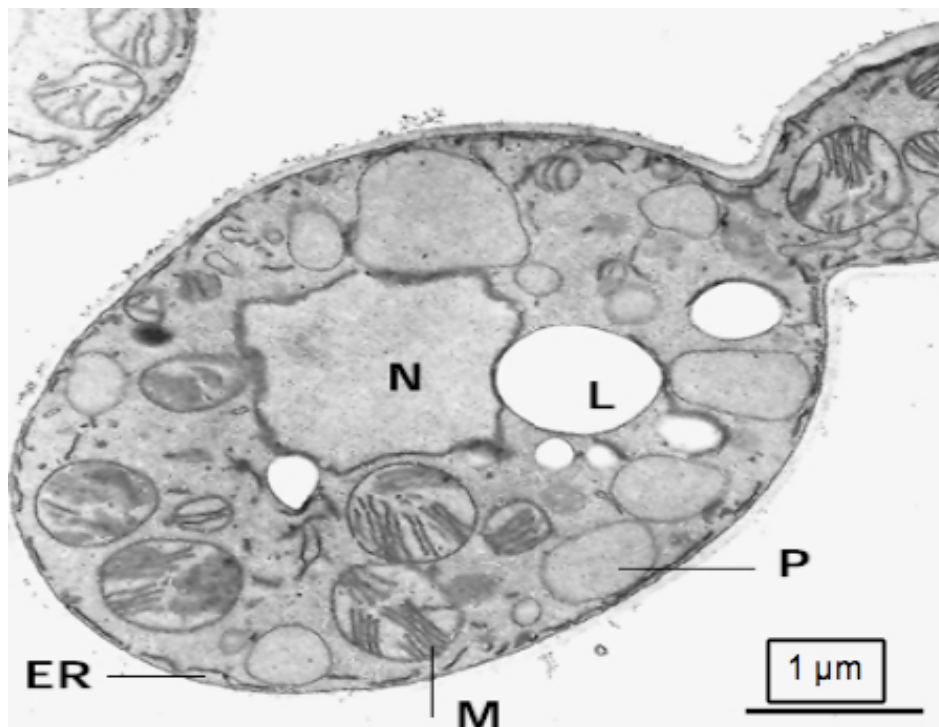


Abbildung 2 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Hefezelle *Yarrowia lipolytica*. **ER** = Endoplasmatisches Retikulum; **L** = Lysosom; **M** = Mitochondrium; **N** = Zellkern; **P** = Peroxisom. Quelle: Titorenko & Rachubinski 2001

Zellkompartimente sind von besonderer Bedeutung, da die hier stattfindenden Reaktionen bei Ablauf im freien Zytosol der Zelle schaden würden und häufig ein spezifisches chemisches Milieu benötigen. Das Innere von Peroxisomen oder Mitochondrien wird als Matrix bezeichnet. Enzyme bestimmter Stoffwechselreaktionen kommen ausschließlich in der Matrix der jeweiligen Organellen vor. Außerdem finden sich hier erhöhte Konzentrationen von Enzymen, die toxische Metabolite eliminieren können.

De Duve hat als erster die wichtige Rolle des Peroxisoms bei einer Vielzahl von Stoffwechselreaktionen, an denen Oxidasen und Katalase beteiligt sind, beschrieben. So findet in Peroxisomen unter anderem die β -Oxidation überlangkettiger Fettsäuren und die Entgiftung durch Abbau des hierbei anfallenden H_2O_2 statt. Ein Überblick über die Funktionen ist in Tabelle 1 zusammengestellt.

| | Hefe | Pilze | Pflanzen | Säugetiere | Menschen |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--|--|
| Biosynthese | Lysin | Penizillin | | Ether-Phospholipide Cholesterol Gallensäuren Mehrfach ungesättigte Fettsäuren | Ether-Phospholipide Cholesterol Gallensäuren Mehrfach ungesättigte Fettsäuren |
| Abbau | H_2O_2 | H_2O_2 | H_2O_2 | H_2O_2 | H_2O_2 |
| | Glyoxylatzyklus | Glyoxylatzyklus | Glyoxylatzyklus | Prostaglandine | |
| | Aminosäuren | | | Aminosäuren | |
| | Methanol | | Photorespiration | Polyamine | |
| | | | Purine | Purine | Purine |
| | | | | α -Oxidation | α -Oxidation |
| | β -Oxidation | β -Oxidation | β -Oxidation | β -Oxidation | β -Oxidation |

Tabelle 1 Peroxisomale Stoffwechselfunktionen verschiedener Spezies, Quelle: Mayerhofer, P.U.

Störungen der peroxisomalen Funktionen führen zu klinischen Bildern schwerer Ausprägung, deren gravierenste Erscheinungsform das cerebro-hepato-renale Syndrom ist, besser bekannt als Zellweger Syndrom (Bowen 1964; Wanders 2004).

1.2.2 Peroxisomale Stoffwechselkrankheiten

Genetische Erkrankungen, die eine Fehlfunktion oder die ausbleibende Synthese von Peroxisomen zur Folge haben, fallen durch eine Vielzahl schwerwiegender Fehlbildungen auf. Peroxisomal bedingte Störungen treten mit einer Häufigkeit von ca. 3-4/ 100 000 auf (*Applegarth 2000*).

Man unterscheidet peroxisomale Stoffwechselkrankheiten mit Störung der peroxisomalen Biogenese und Krankheiten mit fehlerhafter Funktion einzelner peroxisomaler Proteine (Tabelle 2). Letztere können den drei peroxisomalen Fettstoffwechsel-Syntheseschritten (α - und β -Oxidation und Etherphospholipidsynthese) zugeordnet werden. Zudem finden sich Störungen der Mevalonat-Kinase, der Katalase und der AGT (Glyoxylat-Aminotransferase), wie auch des *Trim37p*-Gens (*Wanders 2004*).

Störungen der peroxisomalen Biogenese werden phänotypisch unterteilt in das Kontinuum des Zellweger-Spektrums (Zellweger Syndrom, Neonatale Adrenoleukodystrophie, Infantile Refsum-Erkrankung) und die Rhizomele Chondrodysplasia punctata. 80% der Patienten fallen in die Gruppe des Zellweger-Spektrums mit der schweren Form des Zellweger-Syndroms (auch zerebro-hepato-renales Syndrom), das erstmals 1964 von Bowen et al. beschrieben wurde. Grund der Krankheit sind autosomal rezessiv vererbte, genetische Störungen eines oder mehrerer Proteine, die für die frühe Biogenese der Peroxisomen notwendig sind (Peroxine) (*Kelley 1986, Brul 1988*). In knapp einem Prozent der Fälle wird der Phänotyp des Zellweger-Syndroms mit schwerer klinischer Ausprägung durch eine *PEX19*-Defizienz verursacht (*Ebberink et al 2011*). Die Neugeborenen fallen durch Gesichtsanomalien mit Hypoplasie der Orbitabögen, Epikanthus, Mikrognathie, rechteckigem Gesicht und breiter Nasenwurzel (Abbildung 3) und ferner durch extreme Muskelhypotonie, fehlende Muskeleigenreflexe, epileptische Anfälle und schwere psychomotorische Retardierung auf (*Schutgens 1984*). Die Überlebenszeit ist meist kürzer als ein Jahr.

| Störung | Abkürzung | Betroffenes Protein |
|---|---------------------|----------------------|
| <i>Störungen der peroxisomalen Biogenese</i> | | |
| Zellweger Syndrom | ZS | Peroxine |
| Neonatale Adrenoleukodystrophie | NALD | Peroxine |
| Infantiles Refsum-Syndrom | IRE | Peroxine |
| Hyperpipecolische Azidämie | HPA | Peroxine |
| Rhizomele Chondrodysplasia I | RCDP type 1 | Pex7p |
| <i>Störungen einzelner peroxisomaler Enzyme oder Proteine</i> | | |
| X-linked Adrenoleukodystrophie (β°) | X-ALD | ALDP |
| Acyl-CoA-Oxidase Mangel (β°) | ACOX1-deficiency | SCOX/ ACOX 1 |
| Bifunktionelles Enzym Mangel (β°) | D-BP deficiency | D-BP/MF2/MFEII/D-PBE |
| 2-Methylacyl-CoA-Racemase Mangel (β°) | Racemase deficiency | AMACR |
| Rhizomele Chondrodysplasia II (E°) | RCDP type 2 | DHAPAT |
| Rhizomele Chondrodysplasia III (E°) | RCDP type3 | ADHAPS |
| Refsum-Syndrom (α°) | ARD | PAHX |
| Hyperoxalurie I | PH1 | AGT |
| Glutarazidurie Typ 3 | GA3 | ? |
| Mevalonatkinase-Mangel | MK-deficiency | MVK |
| Akatalasämie | - | Catalase |
| Mulibrey-Kleinwuchs | MUL | Trim37p |

Tabelle 2 Peroxisomale Stoffwechselkrankheiten. β° = Störungen der β -Oxidation, E° = Störungen der Etherphospholipid Biosynthese, α° = Störungen der α -Oxidation Quelle: Wanders 2004.



Abbildung 3 Bild eines Patienten mit Zellweger-Syndrom. Quelle: Rosewich, H.

Zur Diagnostik der peroxisomalen Biogenesestörungen werden einerseits Metabolite der peroxisomalen Dysfunktion wie die Akkumulation überlangkettiger Fettsäuren und Phytansäure, eine verminderte Etherlipidbiosynthese und abnorme Gallensäuremetabolite nachgewiesen (Bezman 2001, Aubourg 1985, Aubourg 1986). Andererseits zeigen morphologische Untersuchungen an kultivierten Fibroblasten der Patienten häufig das Vorhandensein so genannter *peroxisomal ghosts*, residuale peroxisomale Membran-Strukturen ohne Matrixproteine (Santos 1988).

Eine kausale Therapie für Patienten mit peroxisomalen Biogenesestörungen existiert leider nicht. Einzig durch allgemeine Maßnahmen wie die Senkung toxischer biochemischer Parameter wie Bilirubin, die Zufuhr von fettlöslichen Vitaminen oder der Verzicht auf Kuhmilchprodukte kann zu einer Abschwächung und Verzögerung des

Krankheitsprozesses führen (Steinberg 2003). Die Patienten versterben im frühen Säuglingsalter.

1.2.3 Peroxisomale Biogenese

Membranbiogenese, Bedeutung von PEX19 und PEX3

Da Peroxisomen im Gegensatz zu Mitochondrien keine DNA beinhalten und im Inneren der Organelle keine Translation stattfinden kann, müssen alle peroxisomalen Proteine nach der Synthese an freien Polyribosomen aus dem Zytosol importiert werden. Im Rahmen der Erforschung peroxisomaler Stoffwechselerkrankungen war die Beschreibung der am Anfang der Biosynthese stehenden Peroxine von besonderer Bedeutung. Wenn eine peroxisomale Stoffwechselerkrankung durch Mutation der Gene *PEX3*, *PEX16* oder *PEX19* verursacht wird, konnte gezeigt werden, dass keine *peroxisomal ghosts* nachzuweisen sind und demnach bereits die initialen Schritte der Biogenese gestört sein müssen (Purdue 2001; Muntau 2000). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in diesen Zellen nach Transfektion mit den entsprechenden *PEX*-Genen wieder importfähige Peroxisomen entstehen (Kunau 2005), was eine Beteiligung der Peroxine *PEX3*, *PEX16* und *PEX19* an der frühen Membransynthese bestätigt (Abbildung 4).

Ein wesentlicher Schritt am Anfang der Biogenese ist der Einbau peroxisomaler Membranproteine (PMP) in die peroxisomale Membran. Man unterscheidet PMP der Klasse I und PMP der Klasse II. PMP der Klasse I werden von freien Ribosomen im Zytosol synthetisiert und müssen anschließend in die Membran importiert werden. Man geht heute davon aus, dass *PEX3* hierbei die Rolle eines Andock-Faktors für *PEX19* an der peroxisomalen Membran übernimmt. Für die Funktion von *PEX19* gibt es verschiedene Modelle. Es konnte in der Hefezelle gezeigt werden, dass fast alle untersuchten PMP mit *Pex19p* spezifisch über den *membrane peroxisomal targeting signal* (mPTS) interagieren: *Pex3p*, *Pex10p*, *Pex11Bp*, *Pex12p*, *Pex13p*, *Pex14p*, *Pex16p*, *Pex26p*, *ABCD1*, *ABCD2*, *ABCD3*, *PXMP2*, *PXMP3* und *SCL25A17* (*BioGRID*, *HPRD Datenbank*). Ob *PEX19* ein Rezeptor im freien Zytosol ist, der als Transporter die PMP in stabiler, gebundener Form zum membranständigen *PEX3* bewegt (Sacksteder 2000; Jones 2004; Fujiki 2006; Agrawal 2013; Yagita 2013) oder ob *PEX19* ebenfalls membranständig ist, sei es an der peroxisomalen Membran (Snyder 2000; Fransen

2001; Fransen 2004) oder am endoplasmatischen Retikulum (Hoepfner 2005), kann noch nicht mit Sicherheit beantwortet werden (Theodoulou 2013).

PMP der Klasse II (z.B. PEX3 und PEX16) werden durch einen anderen, bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärten Vorgang in die Membran des Peroxisoms eingebaut (Heiland 2005; Schliebs 2004; Snyder 1999). In der Hefezelle konnte gezeigt werden, dass Pex19p auch hier eine essentielle Rolle spielt, da es mit neu synthetisiertem Pex3p einen löslichen Komplex im Zytosol bildet und das Peroxin dann direkt zum Peroxisom transportiert. Pex16p fungiert hierbei als spezifischer, membranständiger Rezeptor für den Pex3p-Pex19p-Komplex (Matsuzaki, 2008; Van Ael, 2006; Fujiki, 2012).

Import von Matrixproteinen

Im weiteren Verlauf der Biogenese werden Matrixproteine über die PMP ins Innere der Zellorganelle eingeschleust (Fransen 2004). Der Proteinimport in die Matrix des Peroxisoms ist ein essentieller Schritt im weiteren Prozess der peroxisomalen Biogenese und Reifung (Wanders 2004; Heiland 2005). Proteine, die für den Transport vom freien Ribosom in die Matrix des Peroxisoms bestimmt sind, tragen spezifische Signalsequenzen. Man unterscheidet Matrixproteine, die durch „peroxisomal targeting signals“ (PTS) 1 und PTS 2 markiert werden. Im Zytosol bindet PEX5 an PTS 1 und PEX7 an PTS 2 (Olsen 1998; Subramani 2000; Thoms 2006). Die durch diese Transportperoxine gebundenen Proteine docken an membranständige Peroxine an (Albertini 1997; Erdmann 1996). Anschließend werden die Proteine über transmembranös liegende Peroxine in das Innere der Organelle transportiert (Chang 1999). Für PEX5, das im Rahmen seiner Funktion als Transporter ins Peroxisom gelangt ist, konnte gezeigt werden, dass es wieder in das Zytosol zurücktransportiert wird, um dem nächsten Proteinimport zur Verfügung zu stehen (Thoms 2006).

Modelle „Wachstum und Teilung“ und „de novo Synthese“

Die Diskussion über die Entstehung von Peroxisomen beinhaltet kontroverse Modelle. So vermuteten Lazarow und Fujiki (Lazarow 1985), dass Peroxisomen ausschließlich durch Wachstum und Teilung entstehen. Bestätigung sahen die Autoren in der Tatsache, dass peroxisomale Proteine an freien Ribosomen synthetisiert werden und nach der Translation in die Zellorganelle transportiert werden. Diese Eigenschaft teilen sie sich mit den Mitochondrien und Chloroplasten (Purdue 2001; Lazarow 2003).

DeDuve nahm an, Peroxisomen seien nur zu primitiven Stoffwechselschritten in der Lage und hielt es daher für möglich, dass es sich wie bei den Mitochondrien um autonome Organellen endosymbiontischer Herkunft handle, was aber heute wohl ausgeschlossen werden kann (DeDuve 1996). Die im Rahmen genetisch bedingter, peroxisomaler Störungen häufig mikroskopisch nachgewiesenen *peroxisomal ghosts*, leere Membranstrukturen ohne Matrix-Proteine, (Santos 1988), legen eine de novo Synthese nahe, an deren Anfang die Membransynthese steht und in deren Verlauf die Proteine in ein Präperoxisom transportiert werden (Subramani 2000).

Neuere Erkenntnisse stützen eine These, nach der der erste Schritt der peroxisomalen Biosynthese die Einlagerung von PEX3 in die Biomembran des ER ist. PEX3 wiederum führt zur Einlagerung von PEX19, was zu einer Ausstülpung der Membran aus dem ER führt. Demnach würde sich das Präperoxisom von der Biomembran des ER ableiten (Abbildung 4) (Hoepfner D. 2005; Tabak, 2003; Kunau 2005; Titorenko V.I. 2006).

In jedem Fall wird die physiologische Relevanz einer de novo Synthese im Gegensatz zum Modell Wachstum-und-Teilung weiterhin kontrovers diskutiert (Schrader M. 2008). Es gibt Anhaltspunkte, dass in Hefezellen, in denen es bereits Peroxisomen gibt, die de novo Synthese zu Gunsten dem Modell Wachstum und Teilung fast vollständig in den Hintergrund tritt, da sie im Falle eines vermehrten Bedarfs an Peroxisomen schlichtweg langsamer erfolgt (Motley A.M. 2007; Jourdain I. 2008), wohingegen Hefezellen ohne Peroxisomen durchaus zur Neubildung der Organellen im Stande sind (Changle M. 2009). In Säugetierzellen scheint es jedoch unabhängig von bereits existierenden Peroxisomen stets neben Wachstum und Teilung auch zur de novo Synthese zu kommen (Kim P.K. 2006). Unabhängig davon ist PEX19 für jeden Biogeneseweg von essentieller Bedeutung, da es im Falle einer de novo Biogenese durch die Interaktion mit PEX3 beteiligt ist und im Falle von Wachstum und Teilung sowohl für den Einbau neuer Membranproteine in das wachsende Peroxisom verantwortlich ist, als auch bei der Teilung der Peroxisomen eine wichtigere Rolle als ursprünglich angenommen spielt (Agrawal 2013). So ist hFis1 ein Membranprotein, das für die Teilung von Peroxisomen wie auch Mitochondrien benötigt wird, und als Klasse I PMP nur über PEX19 und PEX3 in die Membran importiert werden kann (Delille, 2008).

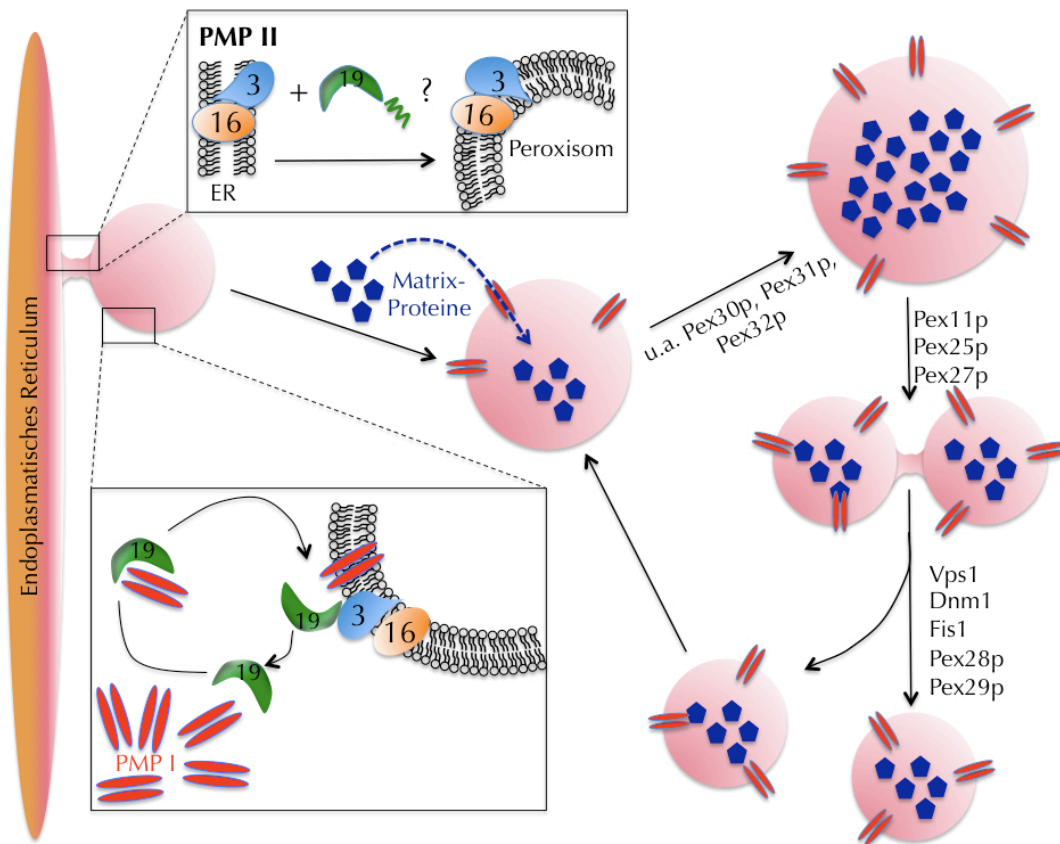


Abbildung 4 Modell der peroxisomalen Biogenese in der Hefezelle. Links ist das Endoplasmatische Retikulum dargestellt, aus dessen Biomembran sich durch Interaktion mit den PMP der Klasse II Pex3p und Pex16p, sowie möglicherweise Pex19p (Kasten oben links) die peroxisomale Biomembran rekrutieren könnte. Anschließend erfolgt der Einbau der PMP der Klasse I durch Bindung an Pex19p im freien Zytosol und Transport an den „Docking-Komplex“ aus Pex3p und Pex16p (Kasten unten links). Über die PMP I werden die Matrixproteine in das Peroxisom transportiert. Vermittelt durch Pex30p, Pex31p und Pex32p kommt es zum Wachstum des reifen Peroxisoms. Die Teilung des Peroxisoms geschieht unter Einwirkung von Pex11p, Pex25p und Pex27p, die Trennung durch Vps1, Dnm1, Fis1, Pex28p und Pex29p. Das neu entstandene Peroxisom nimmt anschließend an dem Kreislauf wieder teil, beginnend mit Proteinimport durch die PMP I. Quelle: *Platta, H. W.*

1.2.4 Genetische Organisation und molekulare Charakterisierung von *PEX19*

Für *PEX19* konnten durch Analyse in der ProDom Datenbank und Testung durch das NCBI-BLASTP-Programm drei Domänen nachgewiesen werden (*Kammerer 1997*). Eine Domäne ist ein Bereich innerhalb der Aminosäuresequenz, dem mittels bioinformatischer Analyse durch Sequenzvergleich bestimmte funktionelle oder

strukturelle Eigenschaften zugewiesen werden können. Die erste Domäne D1 reicht vom N-Terminus bis Aminosäure 87, Domäne D2 reicht von Aminosäure 88 bis 272 und Domäne D3 reicht von Aminosäure 272 bis zum C-Terminus. Die Bindestelle für PEX3, die zum Andocken an die peroxisomale Membran benötigt wird (*Fransen 2001*), reicht vom N-Terminus bis Aminosäure 51, liegt also in Domäne D1. Die Bindungsstelle für PEX14, einem für den Import peroxisomaler Matrixproteine essentiellen Peroxin wird durch die Aminosäuren 60-91 kodiert, also durch Teile der Domäne D1 und D2. Die Bindungsstelle für zahlreiche weitere PMP (PEX11, PEX16, PEX26), die im Rahmen der peroxisomalen Membranbiogenese gebunden werden, finden sich zwischen Aminosäure 124 und 299, also Domäne D2 und D3 (*Fransen 2005*). Zudem konnte gezeigt werden, dass das Protein am C-Terminus nach der Translation farnyliert wird. Eine Farnelysierung ist eine posttranslationale Modifikation, bei der es zu einer Bindung einer Farnesylgruppe an die Cysteinyreste des Proteins kommt. Dadurch entsteht an PEX19 eine hydrophobe Gruppe, welche eine effizientere Bindung und Verankerung der PMP in die Zellmembran ermöglicht (*Rucktäschel 2009*).

Es existieren vier verschiedene Splicevarianten von *PEX19*. Neben der in der Regel am häufigsten vorkommenden Volllänge Variante *PEX19-all* (Isoform 1; Synonym: *PXF-all*; SWISSPROT-Nr.: P40855-1) die alle acht Exons des Gens enthält, gibt es noch eine zweite regelmäßig nachweisbare Variante, der das zweite Exon und damit die Domäne D1 fehlt: *PEX19Δ2* (Isoform 2; Synonym *PEX19-delta-2*, *PXFΔ2*, *PXF lacking exon 2*; SWISSPROT-Nr.: P40855-2). Hinzu kommt eine Splicevariante ohne Exon 4, *PEX19Δ4* (Isoform 3, SWISSPROT-Nr.: P40855-3), die als Protein bisher nicht *in vivo* nachgewiesen werden konnte, und *PEX19Δ8* (Isoform 4, SWISSPROT-Nr.: P40855-4), der nur ein 52 Basenpaare langer Teil des achten Exons und damit Teile der Domäne D3 sowie die Farnelysierung fehlen und die in etwa der gleichen Menge vorhanden ist wie *PEX19Δ2* (Abbildung 5) (*Kammerer 1997*).

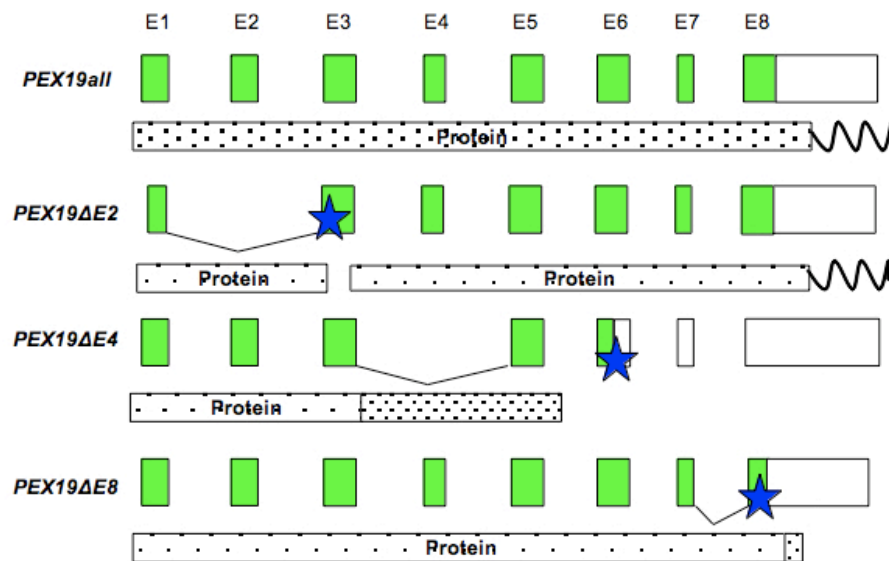


Abbildung 5 Schematische Darstellung der natürlich vorkommenden PEX19-Splicevarianten. Oben *PEX19* in vollständiger Länge. Es folgen die Splicevarianten *PEX19Δ2*, *PEX19Δ4* und *PEX19Δ8*. Die mit E1 – E8 beschrifteten Boxen stehen für die Exons, wobei die grüne Färbung die Abschnitte kennzeichnet, die im Rahmen der Translation abgelesen wurden. Die so synthetisierten Proteine werden durch die gepunkteten Balken dargestellt. Die blauen Sterne entsprechen den durch *frame shift* nach dem Splicen neu entstehenden Stopcodons. Die gekringelte schwarze Linie stellt die Farnelysierung dar. Quelle: S. Kammerer.

1997 konnte im Rahmen der Untersuchung verschiedener Gewebe hinsichtlich des Vorkommens der Splicevarianten mittels RT-PCR und DNA-Gelelektrophorese gezeigt werden, dass *PEX19Δ2* in allen Geweben in relevanter Menge vorkommt, im Uterus konnte sogar ein umgekehrtes Verhältnis mit einem höheren Anteil der Splicevariante festgestellt werden (Abbildung 6) (Kammerer 1997). Betrachtet man *PEX19Δ2* genauer, so fällt auf, dass hier durch *frame shift* ein vorgezogenes Stopcodon („PTC“) vorliegt, das diese Splicevariante als potentiellen Kandidaten für einen besonders schnellen Abbau durch NMD kennzeichnet.

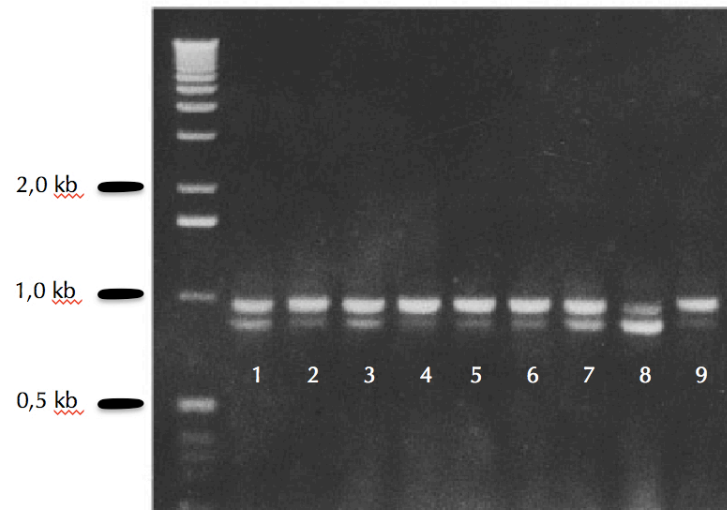


Abbildung 6 Horizontale DNA-Gelelektrophorese. Es wurden verschiedene menschliche Gewebe und Zellen analysiert. Die Auswertung erfolgte in einem einprozentigen Agarosegel. Die obere Bande entspricht jeweils *PEX19*, die untere *PEX19Δ2*. In der ersten Spalte (M) wurde ein 1-kb Größenmarker aufgetragen; **1**: Kolon; **2**: Plazenta; **3**: Lunge; **4**: Leber; **5**: HepG2; **6**: Fibroblasten; **7**: Niere; **8**: Uterus; **9**: Thymus. Quelle: Kammerer, S.

Außerdem konnte für *PEX19*-defiziente Fibroblasten nach Transfektion mit *PEX19* gezeigt werden, dass diese wieder zur Biogenese funktionsfähiger Peroxisomen fähig waren, es jedoch nach Transfektion mit der Splicevariante *PEX19Δ2* nicht zur funktionellen Komplementation kam und sich daher keine volle Funktionsfähigkeit für *PEX19Δ2* vermuten lässt.

1.3 Zielsetzung

PEX19 codiert für ein essentielles Protein der peroxisomalen Biogenese, bei dessen Verlust es zu dem schwerwiegenden und bislang nicht therapierbaren Krankheitsbild des Zellweger Syndroms kommt. Um einen Beitrag zur Entwicklung neuer Therapiestrategien leisten zu können, ist es unabdingbar, *PEX19* und seine Funktionen besser verstehen zu lernen. Neben dem Volllänge-Protein wurde insbesondere die Splicevariante *PEX19Δ2* beschrieben und in relevanten Mengen nachgewiesen, dabei konnte für sie jedoch keine volle Funktionsfähigkeit gezeigt werden. Es stellt sich daher die Frage, welche Bedeutung der Splicevariante zukommt: Trägt sie nur teilweise Funktionen von *PEX19* und falls ja, werden diese durch NMD der Splicevariante reguliert? Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, durch Quantifizierung der Splicevariante

zu bestätigen, dass *PEX19Δ2* als mRNA in signifikanten Mengen vorkommt und zu überprüfen, ob und in welchem Ausmaß *PEX19Δ2* einem NMD unterliegt.

Die bekannte Funktion von PEX19 ist bislang über seine Interaktion mit PMP beschrieben. Um nun weiter zu analysieren, ob die Splicevariante einzelne Funktionen des Volllänge-Proteins mitträgt, war das zweite Ziel dieser Arbeit die Untersuchung des Interaktionsmusters der Splicevariante im Vergleich zum Volllänge-Protein PEX19.

Um diese Ziele zu erreichen, sollte ein experimentelles Verfahren etabliert werden, um RNA aus Gewebeproben verschiedener Organe von Probandinnen zu isolieren und in cDNA zu transkribieren. Diese sollte anschließend mittels quantitativer Real-Time PCR ausgewertet werden. Um eine Aussage zur absoluten Menge der jeweiligen Splicevarianten machen zu können, sollte zudem die Effizienz der Primerpaare mittels Verdünnungsreihen bestimmt werden. Des weiteren sollte eine Methode zur effektiven Hemmung und Messung von NMD durch Protein-Biosynthese-Inhibitoren, Markierung mit S^[35]-Methionin und anschließender Überprüfung mit dem Betacounter etabliert werden. Schließlich sollte eine auf Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer (BRET) basierende Methode angewendet werden, um die Interaktionen von PEX19 und der Splicevariante mit verschiedenen PMP in der lebenden Zelle zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 RNA-Isolierung und Reverse Transkription

2.1.1 RNA-Isolierung aus Gewebeproben

Alle Gewebeproben wurden uns in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. K. Anslinger vom Institut für Rechtsmedizin der LMU München zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Organproben, die während der Obduktion von vier Frauen im gebärfähigen Alter entnommen wurden. Der Todeszeitpunkt lag jeweils nicht länger als wenige Stunden zurück.

RNA hat eine wesentlich kürzere Halbwertszeit als DNA, da sie von den ubiquitär vorkommenden RNAsen schnell abgebaut wird. Dementsprechend ist bei der Arbeit mit RNA auf Sterilität der verwendeten Geräte und Vermeidung von Kontaminationen mit RNAsen geachtet worden. Der Arbeitsplatz und die Arbeitsgeräte wurden mit unvergälltem EtOH und anschließend mit einem RNase-Hemmer (RNase Zap, Ambion, Darmstadt) gereinigt. Die Proben wurden unmittelbar nach Erhalt in RNAlater (QUIAGEN, Hilden) gegeben und auf Eis gelagert. Die Zeit zwischen Erhalt der Gewebeproben und Isolierung der RNA wurde möglichst kurz gehalten. RNA wurde möglichst schnell in haltbare cDNA transkribiert. Nicht verarbeitete RNA wurde vor Licht geschützt bei -20°C aufbewahrt, die Gewebeproben wurden lichtgeschützt bei -80°C aufbewahrt.

Zur Gewinnung der gesamten RNA aus Gewebeproben wurde das RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet, die Vorgehensweise entsprach dem Arbeitsprotokoll des Herstellers. Ca. 30 mg schwere (ca. 3 mm³) Gewebestücke wurden in 350 µl RLT-Puffer mit einem Gewebeschredder (POLYTRON von KINEMATIKA AG, Luzern) homogenisiert und anschließend zentrifugiert und der Überstand an RLT-Puffer abpipetiert. Das Lysat wurde nun mit einem gleichen Teil 70% EtOH vermischt und bis zu 700 µl unmittelbar danach auf die Säule (Rneasy Mini Spin Columns) aufgetragen. Anschließend wurde für 15 sek. bei 8000 g zentrifugiert. Zur Reinigung der Filtermembran wurden dann zuerst 700 µl RW1-Puffer aufgetragen, dann zweimal je 500 µl RPE-Puffer mit jeweiliger Zentrifugation bei 8000 g. In einem letzten Schritt wurde die in der Membran gebundene RNA mit 50 µl RNA-freiem Wasser durch

Zentrifugieren ausgewaschen und mittels Ultraviolett Absorptionsspektrometrie vermessen.

2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Ultraviolett Absorptionsspektrometrie

Die Konzentration gelöster DNA und RNA kann mit der Ultraviolett Absorptionsspektrometrie bestimmt werden. Die zu vermessene Probe wurde mit UV-Licht im Photometer (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Offenburg) durchleuchtet und der Extinktionswert ermittelt. Hierzu wurde zweimal der Nullwert mit 495 µl destilliertem Wasser ermittelt, bevor 5 µl der RNA-haltigen Lösung zur Vermessung hinzugefügt wurden.

Für Nukleinsäuren wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine OD-Einheit entspricht einer Konzentration von 50 µg pro ml doppelsträngiger DNA beziehungsweise 40 µg pro ml RNA. Im Rahmen dieser Arbeit lagen die Konzentrationen der RNA nach Extraktion zwischen 0,4 und 7,72 µg/ml.

Um die Reinheit der jeweiligen Nukleinsäure beurteilen zu können, bestimmten wir ebenfalls den Extinktionswert bei 280 nm. Dieser lässt Rückschlüsse auf die Konzentration von Aminosäuren zu. Der Quotienten der beiden Werte (OD 260 nm:OD 280 nm) lag bei allen Proben im Sollbereich zwischen 1,65 und 1,9.

2.1.3 Reverse Transkription

Vor der PCR (siehe 2.2) muss die isolierte Gesamt-RNA mithilfe einer retroviralen Reverse-Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Als Primer dient hierbei ein Poly-dT-Primer, der selektiv an mRNA bindet, da diese mit dem für die Proteinsynthese charakteristischen Poly-A 3'-Ende versehen sind. So bleibt die ribosomale RNA, welche den größeren mengenmäßigen Anteil der isolierten Total-RNA einnimmt, untranskribiert. Bei der quantitativen Auswertung der Splicevarianten ist zu beachten, dass solche Genabschnitte, die näher am Poly-A 3'-Ende liegen, verhältnismäßig stärker transkribiert werden als Genabschnitte, die näher am 5'-Ende liegen. Dies liegt daran, dass das Enzym Reverse Transkriptase den Umschreibevorgang gelegentlich spontan abbricht, bevor der vollständige Strang übersetzt ist. Als Konsequenz hieraus mussten die beiden zu vergleichenden Genabschnitte der jeweiligen Splicevarianten ungefähr gleich weit vom Poly-A 3'-Ende entfernt liegen.

Für die Reaktion wurde das iScript cDNA Synthesis Kit (BIORAD, Hercules, USA) verwendet. In einem Ansatz von 20 µl wurde hier 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt und auf die im Protokoll des Herstellers angegebene Art transkribiert.

| iScript® Ansatz | |
|-------------------------------|------------------------|
| | Volumen |
| 5x iScript Reaction Mix | 8 µl |
| iScript reverse Transcriptase | 2 µl |
| RNA-Template | 1 µg total RNA |
| Bidestilliertes Wasser | Auf 40µl Gesamtvolumen |

Wegen der kurzen Halbwertszeit der RNA wurde der Zeitraum zwischen RNA-Isolierung und cDNA Synthese möglichst kurz gehalten. Um eine bessere Haltbarkeit zu erreichen, wurde die cDNA nach der Transkriptions-Reaktion bei -20°C lichtgeschützt aufbewahrt, für längere Lagerzeiten bei -70°C.

2.2 Etablierung einer Real-Time-quantitativen RT-PCR-Methode zur quantitativen Bestimmung der Splicevarianten

Ziel der Polymerasekettenreaktion (PCR) ist die effiziente, vollautomatische, exponentielle Vervielfältigung von DNA-Sequenzen innerhalb kurzer Zeit, wie sie Mullis erstmals unter Nutzung der Thermostabilität der DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq) gelang (Mullis, 1986; Mullis, 1987)

Hierbei können in Länge und Sequenz definierte Nukleinsäureabschnitte *in vitro* selektiv aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen angereichert werden. Ein DNA-Abschnitt wird von zwei Oligonukleotid-Primern an jeweils spezifischen, gegenläufigen Stellen eines DNA-Einzelstrangs gebunden. An den beiden Primern bindet thermostabile DNA-Polymerase, die einen komplementären Einzelstrang synthetisiert. Die PCR-Reaktion verläuft in verschiedenen Reaktionsschritten bei unterschiedlichen Temperaturen und führt durch ständige Wiederholungen zur exponentiellen Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnittes.

Im ersten Zyklus, der „Denaturierung“ wird die als Template eingesetzte DNA-Doppelhelix auf 95°C erhitzt, damit sie schmilzt, sich trennt und so zwei Einzelstränge

ergibt. Im zweiten Zyklus wird die Reaktionstemperatur soweit gesenkt, dass die Primer an den DNA-Einzelstrang binden können („*Annealing*“). Durch die Wahl der Annealingtemperatur kann die Spezifität der PCR-Reaktion bestimmt werden. Sie ist direkt abhängig von der Sequenz und der Länge des verwendeten Primerpaares.

Anschließend wird der Reaktionsansatz bei der optimalen Reaktionstemperatur der verwendeten, thermostabilen DNA-Polymerase inkubiert, die nun den komplementären Strang synthetisieren kann („*Elongation*“). Je nach Menge des eingesetzten Templates und Konzentration des gesuchten Genabschnittes werden die Amplifikationszyklen 20 bis 50 mal wiederholt.

2.2.1 Bestimmung spezifischer Primerpaare

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer wurden von der Firma Metabion International AG, Martinsried, Deutschland HPLC-gereinigt und synthetisiert. Es wurde eine einheitliche Primerlänge von ca. 20 Basen angestrebt, die Schmelztemperatur lag für alle Primer im engen Bereich zwischen 55,9°C und 58,8°C. Der Anteil der Basen Guanin und Cytosin lag zwischen 50% und 60%. Das so flankierte Amplifikat zeigte jeweils eine Länge von 100-120 Basen und ebenfalls einen Anteil von Guanin und Cytosin von 50% bis 60%.

| Primer | Sequenz | T _m |
|-------------------------|-----------------------------------|----------------|
| PEX19wtEx1/3 <i>for</i> | 5'-TTC TGG AAA GTG CTC TTG ATG-3' | 55,9°C |
| PEX19wtEx1/3 <i>rev</i> | 5'-GAG GGC ATC TTT GGC AGT G-3' | 58,8°C |
| PEX19ΔEx2 <i>for</i> | 5'-CTT CTG GAA AGA TGC CCT-3' | 56,7°C |
| PEX19ΔEx2 <i>rev</i> | 5'-GGT GGG GTT CTT CCT CCT CAG-3' | 58,2°C |
| GAPDH <i>for</i> | 5'-CCA CCC AGA AGA CTG TGG-3' | 58,2°C |
| GAPDH <i>rev</i> | 5'-CTT CCC GTT CAG CTC AGG-3' | 58,2°C |

Tabelle 3 Verwendete Primer für die präparative und Real-Time RT-PCR. T_m zeigt die Schmelztemperatur

Um eine spezifische Amplifikation der Splicevarianten und von *PEX19* zu erreichen banden die Primer direkt über der Verbindungsstelle der spezifischen Exons (Abbildung 7). PEX19wt1/3-*for* markierte einen DNA-Abschnitt, der auf Exon 1 und 2 liegt,

PEX19wt1/3-rev markierte Exon 2 und 3. Damit konnten beide nicht an *PEX19Δ2* binden. Primer PEX19ΔEx2-for lag sowohl auf Exon 1 als auch auf Exon 3 und konnte so nicht an eine der anderen Splicevarianten binden, da bei diesen Exon 1 immer in Exon 2 übergeht.

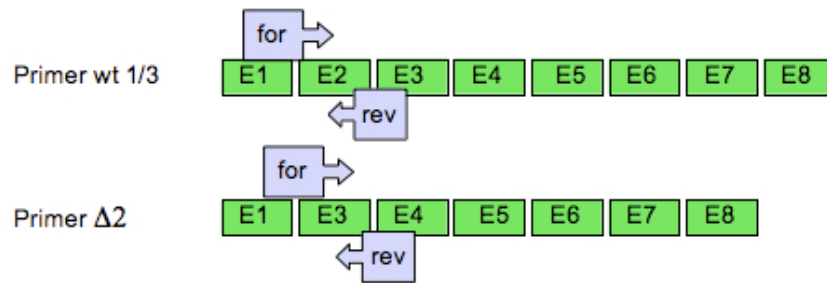


Abbildung 7 Schematische Darstellung der verwendeten Primerpaare. Die grünen Boxen entsprechen den Exons von *PEX19-all* und *PEX19Δ2*. Die blauen Pfeilboxen stehen für die Primer (forward und reverse). Die Primer sind exonflankierend und liegen dabei auf den Verbindungsstellen der jeweiligen Exons. So wird spezifisch die jeweilige Splicevariante erkannt.

Die Primer waren zudem alle etwa gleich weit vom 5'-Ende des DNA-Einzelstrangs entfernt, um durch Strukturunregelmäßigkeiten der mRNA verursachte Fehler und durch Transkription bedingte quantitative Schwankungen möglichst gering zu halten.

Agarose-Gelelektrophorese

Um die Spezifität der Primerpaare wie auch die Fragmentlänge des PCR-Produktes zu überprüfen, wurde im Vorfeld sowie nach jeder quantitativen Auswertung mittels Real-Time RT-PCR eine Gelelektrophorese durchgeführt. Drei Gramm Agarose (Biozym) wurden hierzu in 100 ml TBE-Puffer (SERVA) aufgekocht und mit zwei Tropfen Ethidiumbromid versehen. Anschließend wurde das Gel ausgehärtet und mit jeweils 10 µl post-PCR-Produkt und 2 µl Ladepuffer (Sigma-Aldrich) beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 Volt über 75 min. Die Fragmentlänge konnte Anhand eines 500-bp-DNA-Größenmarkers an der Markerbande für 120 Basenpaare abgelesen werden.

2.2.2 Real-Time PCR

Um die cDNA-Transkripte quantitativ darzustellen, wurde die Methode der Real-Time PCR angewandt. Wie bei der herkömmlichen PCR werden die durch die spezifischen Primer markierten DNA-Abschnitte enzymatisch amplifiziert. Die Menge des so entstehenden PCR-Produktes wird hier jedoch schon während der Reaktion, also in Echtzeit (*Real-Time*), bestimmt. Möglich macht dies der Farbstoff SYBR® Green (*SYBR Green® Supermix*, BIORAD), der nach Interkalierung in die DNA-Doppelhelix fluoresziert. Dies wird von einem Detektor, der das Fluoreszenzsignal erkennt (iCycler) mit hoher Sensitivität erkannt und während der Elongationsphase gemessen. Ausschlaggebend ist der Zeitpunkt, an dem die Intensität des Leuchtstoffes einen bestimmten Schwellenwert übersteigt. Der jeweilige Zyklus, während dem der Fluoreszenz-Schwellenwert erreicht wird, heißt *Threshold Cycle* (Schwellenwert-Zyklus, Ct-Wert). Dieser wird von der Software des Gerätes errechnet, da er je nach Hintergrundstrahlung der einzelnen Proben und Effizienz des jeweiligen Ansatzes beträchtlich schwanken kann.

Die Menge des eingesetzten Templates betrug 0,2 µl (bei 10 µg/ml cDNA) bei den vorausgehenden Messungen zur Ermittlung der Optimierung der PCR, 2 µl bei der Auswertung der Gewebeproben (0,25 µg/ml cDNA), 1 µl bei der Auswertung der *human first strand cDNA* (0,05 µg/ml) und 0,5 µl bei der Auswertung der Fibroblasten (0,5 µg/ml). Die optimale Konzentration wurde in separaten Ansätzen jeweils mittels Verdünnungsreihen ermittelt, in den zu vergleichenden Ansätzen wurde stets die gleiche Menge cDNA eingesetzt.

| Real-Time PCR-Ansatz | | |
|------------------------|------------------|------------|
| | Konzentration | Volumen |
| SYBR Green® Supermix | | 10 µl |
| Primer forward | 0,1 µg/ml | 0,2 µl |
| Primer reverse | 0,1 µg/ml | 0,2 µl |
| Matrize | 0,05 - 0,5 µg/ml | 0,5-2 µl |
| Bidestilliertes Wasser | | 7,6-9,4 µl |

| Real-Time PCR-Programm | | |
|---------------------------|---------------|-----------------------|
| Schritt | | Temperatur Dauer |
| Vordenaturierung | | 95,0°C 5 min |
| Amplifikation (35 Zyklen) | Denaturierung | 95,0°C 30 sek |
| | Annealing | 61,2°C 30 sek |
| | Elongation | 72,0°C 45 sek |
| Nachelongation | | 72,0°C 10 min |
| Schmelzkurve | | 95,0 – 4,0°C |
| HOLD | | 4,0°C |

Am Ende des Programms wurde eine Schmelzkurve erstellt. Die Schmelzkurve dient der Überprüfung der Spezifität des jeweiligen Laufes. Die Reaktionstemperatur wird, beginnend bei 95°C, jeweils in Schritten von 0,5°C bis 1°C gesenkt. Die Temperatur, bei der sich der DNA-Einzelstrang wieder zu einem Doppelstrang zusammenlegt, wird durch einen starken Anstieg der Fluoreszenzsignals registriert, da sich nun wieder SYBR Green in die Doppelhelix einlagern kann. Auf diese Art wurde jedem Amplifikat eine spezifische Schmelztemperatur zugeordnet und nach jeder Messung erfolgte so automatisch die Überprüfung der Spezifität der abgelaufenen Messung.

2.2.3 Absolute Quantifizierung

Da in diesem Versuch die Expression unterschiedlicher Gene aus verschiedenen Gewebeproben untersucht wurde, mussten die jeweiligen Primer hinsichtlich ihrer Effizienz verglichen werden, um eine absolute Quantifizierung zu ermöglichen (Tricarico 2002). Hierzu wurden Verdünnungsreihen der linearen cDNA-Abschnitte angesetzt, um Standardkurven für jedes Primerpaar zu erstellen. Die Verdünnungsstufen reichten von $1 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bis $1 \times 10^{-12} \mu\text{g}/\mu\text{l}$, was den Anforderungen an eine Standardkurve von mindestens fünf Zehner-Potenzen in fünf Schritten entsprach. Die Software des iCyclers ermittelt automatisch den Korrelations-Koeffizienten, welcher entsprechend der Forderung zwischen 0,988 und 0,997 lag.

Anhand der Steigung der so ermittelten Geraden lässt sich die Effizienz des PCR-Ansatzes mit dem jeweiligen Primer ablesen. Die Effizienz einer PCR-Reaktion besagt bei Messungen mit der Real-Time Methode, wann der jeweilige Ct-Wert bei einer

bekannten Konzentration von Primer und cDNA erreicht wird. Beeinflusst wird sie vor allem durch die unterschiedlichen Anteile von Guanin und Cytosin im Verhältnis zu Adenin und Thymin. Wird die Effizienz in die anschließende, quantitative Auswertung mit einbezogen, so kann das Ergebnis durch Unterschiede in der Effizienz nicht mehr verzerrt werden und so kann anhand des Ct-Werts auf die ursprüngliche Kopienzahl der Splicevariante geschlossen werden.

Zur Bestimmung der Kopienzahl wurde zuerst errechnet, wieviele Kopien in den drei Ansätzen zur Ermittlung der Standardkurven eingesetzt wurden. Hierzu wurde das durch Ultraviolettabsorptionsspektrometrie ermittelte Gewicht der eingesetzten Gesamt-DNA durch das anhand von Datenbanken ermittelte spezifische Gewicht der jeweiligen Splicevariante dividiert, da nur ein Teil der Plasmid-cDNA die zu untersuchende Gen-Sequenz enthält. Bei der Auswertung der *human first strand cDNA* wie auch der aus den Gewebeproben gewonnenen cDNA wurde darauf geachtet, dass die verschiedenen Ansätze jeweils die gleiche Menge Template enthielten. Folgend war es dann möglich, über den Ct-Wert anhand der Standardkurve Angaben zur eingesetzten Kopienzahl pro μl zu machen.

2.2.4 Relative Quantifizierung

Die relative Quantifizierung eignet sich besonders zur Darstellung einer Veränderung der Konzentration eines Genabschnittes. Anwendung findet dieses Verfahren, wenn Gewebeproben behandelt werden und die Wirkung der Behandlung auf das Zielgen überprüft wird. Im Rahmen dieser Arbeit bietet sich dieses Auswertungsverfahren vor allem zur Beurteilung einer effektiven NMD-Hemmung an. Bei jeder Messreihe muss hierbei ein Standard-Gen mituntersucht werden.

Hierzu werden so genannte *housekeeping genes* verwendet, da man bei diesen Genen davon ausgeht, dass sie in jeder Zelle konstant exprimiert werden und damit die Menge an exprimierter Gesamt-mRNA widerspiegeln. In der vorliegenden Arbeit wurde dafür *Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase (GAPDH)* verwendet.

Ausgewertet wurde nach der von Livak und Schmittgen entwickelten $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Methode (Livak 2001). Hierbei wurden die Differenzen der Ct-Werte der vor und nach Behandlung zu vergleichenden Proben in die Formel, also in die Potenz von 2 eingesetzt, nachdem jeweils auch der Ct-Wert für das mitbestimmte *GAPDH*

subtrahiert wurde. Das errechnete Ergebnis gibt den Faktor an, um den sich der untersuchte Genabschnitt verändert hat.

2.2.5 Klonierung der Plasmid-DNA für die Verdünnungsreihen

PEX19 und *PEX19Δ2* waren im Rahmen der Arbeiten von S. Kammerer bereits kloniert worden und lagen als Plasmid-DNA vor (Kammerer 1997). *GAPDH* musste für die Anlage der Verdünnungsreihen als Plasmid-DNA kloniert werden.

Präparative PCR

Die Präparative PCR dient zur Synthese bestimmter Genabschnitte, die anschließend für weitere Arbeitsschritte benötigt werden. In dieser Arbeit wurde sie zur Klonierung von *GAPDH* eingesetzt. Für den Reaktionsansatz wurde Template der Leberprobe 285 in Taq Puffer mit Taq Polymerase (Accu Prime Taq DNA-Polymerase High Fidelity und Supermix, Invitrogen, Karlsruhe) in einem Reaktionsansatz von 50 µl angesetzt. Die Annealingtemperatur betrug 61,2°C, die Annealingzeit 30 sek bei 25 Zyklen.

| Ansatz präparative PCR | | |
|------------------------|---------------|----------|
| | Konzentration | Volumen |
| Taq-Puffer | | 5 µl |
| Taq-Polymerase | | 0,75 µl |
| Primer GAPDH forward | 0,1 µg/ml | 1 µl |
| Primer GAPDH reverse | 0,1 µg/ml | 1 µl |
| Matrize | 0,25 µg/ml | 2 µl |
| Bidestilliertes Wasser | | 40,25 µl |

PCR-Purification und Ligation

Das Produkt einer präparativen GAPDH-PCR wurde mit dem PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) von überschüssigen Nukleotiden und Primern gemäß dem Arbeitsprotokoll des Herstellers gereinigt und in Wasser eluiert. 10 µl der gereinigten Probe wurden auf ein 3% Agarose Gel aufgetragen und nach Elektrophorese auf Reinheit und Länge überprüft. Die anschließende Ligation dient der enzymatischen Verbindung der gereinigten DNA-Abschnitten mit einem Plasmidvektor. 5 µl des PCR-

Produktes wurden mit 1 µl pGEM-T-easy Vektor (Promega, Mannheim) 1 µl Ligase und 7 µl Ligase-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe) bei 14°C über 12 std ligiert (Abbildung 8).

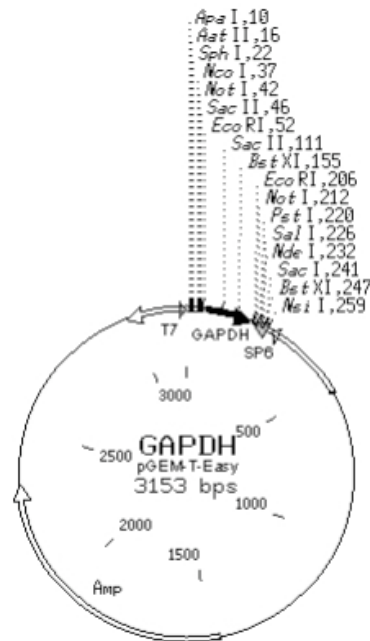


Abbildung 8 Schematische Darstellung des pGEM-T-easy Vektors. Der Vektor ist 3153 Basenpaare lang. Die Gene des mit "Amp" codierten Abschnittes codieren für die zur Amplifizierung notwendige Ampicillin-resistenz.

Transformation

50 µl chemisch kompetente, Ampicillin resistente *Escherichia coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit dem Plasmidvektor suspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem 90 sek Hitzeschock bei 42°C wurde nochmals 2 min auf Eis inkubiert, bevor die Bakterien mit 500 µl Psi-broth-Nährlösung (Sigma, Hannover) für 90 min im Schüttler inkubiert wurden. Die Bakterien wurden mit 3,5 g für 5 min pelletiert und auf ein Festmedium mit Ampicillin ausgestrichen und anschließend über 12 std bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

PCR und Restriktionsverdau

12 Klonstämme wurden von der Agarplatte genommen, lysiert und in 20 µl H₂O gelöst. 5 µl wurden in einem Ansatz mit je 0,2 µl SP6-Primer, T7-Primer, Taq-Polymerase, 2 µl Puffer mit dNTPs und 12,4 µl H₂O angesetzt. Nach 25 Zyklen bei 51°C Annealingtemperatur wurde das Produkt auf 3% Agarosegel hinsichtlich Länge und Reinheit beurteilt.

Ein geeigneter Klon wurde anschließend erneut mit Ampicillin-haltigem Medium über Nacht bei 37°C bebrütet. Die Plasmid-DNA wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep-Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert, pelletiert und dann dem Restriktionsverdau zugeführt und bei 37°C über 12 std inkubiert.

| Restriktionsverdau Ansatz | |
|----------------------------------|----------------|
| | Volumen |
| Plasmide | 3 µl |
| Puffer H (Metabion, Martinsried) | 1,5 µl |
| EcoR1 (Metabion, Martinsried) | 0,5 µl |
| NotI (Metabion, Martinsried) | 0,5 µl |
| Bidestilliertes Wasser | 40,25 µl |

Die Konzentration des so erhaltenen, linearen DNA-Abschnittes wurde mittels Ultraviolettabsorptionsspektrometrie bei 260 nm ermittelt. Es folgte die Auftragung auf ein 1% Agarosegel zur Gelelektrophorese.

Nicht-radioaktive Sequenzierung mittels Cycle Sequencing

Die Sequenzierung dient der Analyse der DNA-Primärstruktur, also der Gensequenz des linearen DNA-Abschnittes (GAPDH). Es soll die korrekte Sequenz des generierten Plasmids überprüfen, da jede Polymerase einer bestimmten Fehlerquote unterliegt. Sie beruht wie die radioaktive Sequenzierung auf der Kettenabbruch-Methode (*Sanger 1977*). Vier mit Fluorescein-Farbstoffen markierte Didesoxynukleotide (Terminatoren) werden verwendet. Der Einbau der markierten Nukleotide erfolgte in nur einem Sequenzier-Ansatz mittels PCR. Der Ansatz wurde gemäß dem Protokoll des BigDye® Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Weiterstadt) verarbeitet.

| Sequenzier-Ansatz | |
|------------------------------|----------------|
| | Volumen |
| Plasmide | 2 µl |
| Primer SP6 | 1 µl |
| Big Dye Mix | 2 µl |
| NotI (Metabion, Martinsried) | 0,5 µl |
| Bidestilliertes Wasser | 40,25 µl |

| PCR-Programm | | | |
|------------------------------|---------------|-------------------|--------------|
| Schritt | | Temperatur | Dauer |
| Vordenaturierung | | 95,0°C | 2 min |
| Amplifikation (25 Zyklen) | Denaturierung | 95,0°C | 30 sek |
| | Annealing | 55,0°C | 10 sek |
| | Elongation | 60,0°C | 4 min |
| HOLD | | 4,0°C | |

Die folgende Alkoholpräzipitierung diente der Trennung von DNA von nicht eingebauten Nukleotiden. Zur Präzipitierung wurde DNA-haltige Flüssigkeit mit 2,5 Teilen Ethanol und 0,1 Teilen Natrium-Acetat 3 M auf Eis vermischt. Dann wurde bei 4°C 20 min mit 15000 rpm zentrifugiert und der Überstand abpipettiert, das Präzipitat mit 3 Teilen 70% Ethanol resuspendiert und nochmals bei 4°C mit 15000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Alkohol mit der Pipette entfernt und die gefällte DNA für 3-4 std im Brutschrank getrocknet.

Die präzipitierten Proben wurden durch die Firma Medigenomix GmbH (Martinsried) auf einem ABI PRISM 377 DNA Sequencer elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung der DNA-Sequenzen erfolgte mit der ABI PRISM Sequence Navigator 1.0.1 Software.

2.3 Bestimmung von NMD

2.3.1 Hemmung der Proteinsynthese *in vivo*

Die Hemmung der Proteinsynthese und damit des NMD wurde an primären humanen Fibroblasten durchgeführt. Für die sterile Kultivierung der Zellen war es notwendig, alle Arbeitsschritte unter der Sterilbank durchzuführen (*laminar flow*). Durch sorgfältiges Reinigen der Arbeitsflächen und Werkzeuge mit 70% EtOH wurde einer eventuellen Kontamination vorgebeugt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5,0% CO₂ in Cell+-Petrischalen mit 3,8 cm² Fläche in 2 ml Medium (Basal Medium Eagle, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe), welches alle zwei bis drei Tage erneuert wurde, kultiviert. Um die Fibroblasten vom Boden der Schale abzulösen, wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen mit 4 ml PBS gespült. Anschließend wurde 1 ml einer Trypsinlösung (0,2 mg Trypsin pro ml) gleichmäßig auf den Zellen verteilt. Das Trypsin löst die Zellen nach einer Inkubation von 5 min im Brutschrank vom Boden der Petrischale ab, ohne die Zellwände zu zerstören. Anschließend wurden 2 ml Serum oder Nährmedium hinzugefügt, um das Trypsin in seiner Wirkung aufzuhalten und die Zellen in eine gut weiter zu verarbeitende Lösung zu bringen.

Im Rahmen der Versuche zur NMD-Hemmung wurden die Fibroblasten bis zum Erreichen eines konfluenten Stadiums parallel in drei Kulturschalen herangezogen. Zu Beginn der Versuche wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen mit 1 ml PBS Puffer gewaschen. Zur Hemmung der Proteinsynthese wurden die Hemmstoffe Puromycin und Cycloheximid (CHX) (Endkonzentrationen 100 µg/ml bzw 29 µg/ml) verwendet. Puromycin ist ein Nukleosid-Antibiotikum, das die Protein-Biosynthese und damit auch den NMD in Prokaryoten wie in Eukaryoten auf Ebene der Translation und des Proteinimports hemmt. CHX, ebenfalls ein Antibiotikum, erreicht den gleichen Effekt auf ribosomaler Ebene. Es wurden 40 µl Puromycin-Stammlösung bzw. 11,6 µl CHX-Stammlösung (10 µg/µl gelöst in H₂O) mit 3,96 ml bzw 3,984 ml Nährmedium vermischt. Die Zellen zweier Kulturschalen wurden darin über 6 std mit dem Puromycin haltigen bzw über eine, zwei und 4 std mit dem CHX-haltigen Nährmedium inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen in einer dritten Kulturschale in 4 ml unbehandeltem Nährmedium für den gleichen Zeitraum inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden die Zellen jeweils zweimal mit 2 ml PBS Puffer gespült und anschließend mit Trypsin nach fünf-minütiger Inkubation vom Boden der Schale gelöst.

Die zweite behandelte Schale wurde nach Entfernung des Nährmediums und zweimaliger Spülung mit 1 ml PBS Puffer wieder mit 2 ml normalem Nährmedium gefüllt und für weitere 3 std im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen dieser Probe auf gleiche Art und Weise trypsinisiert wie die ersten beiden.

Zur Gewinnung der RNA aus adhärenenten humanen Fibroblasten wurden die Zellen nach Trypsinierung bei 350 g für 5 min zentrifugiert und zweimal pelletiert. Anschließend wurden sie mit 500 µl Lysepuffer (i.a. Shredder Kit, QIAGEN, Hilden) versetzt und nach Herstellerangaben weiterverarbeitet. Die anschließende RNA-Isoierung erfolgte wie unter 2.1.1 beschrieben nach dem Herstellerprotokoll des RNeasy Mini Kits. Nach der RNA-Extraktion erfolgte zeitnah die Transkription in cDNA und Auswertung mit Real-Time RT-PCR.

2.3.2 Translationbestimmung durch S^[35]-Markierung und Bestimmung der Radioaktivität

Zur Bestätigung der Proteinsynthesehemmung wurde der Einbau von S^[35]-markiertem Methionin in neu synthetisiertes Protein während der Hemmphase gemessen (*Vekeman, 1993*). Eine Stunde vor der Trypsinierung und der anschließenden Auswertung wurde das Zellmedium durch ein Mangelmedium ersetzt, welches kein Methionin enthält. Nach einer halben Stunde wurde dies dann wieder durch Medium ersetzt, welches ausschließlich S^[35]-markiertes Methionin enthielt (3 µl S^[35]-Methionin Lösung von 10 mCi/ml in 300 µl Nährmedium).

Anschließend wurden die Zellen in der Kulturschale zweimal mit PBS Puffer gewaschen, mit Methanol je zweimal für 5 min inkubiert, mit Aqua dest. gewaschen, mit Trichloressigsäure gespült, dreimal mit Aqua dest. gewaschen, mit 0,3 M NaOH für 15 min lysiert und der Überstand mit der Pipette abgenommen. 5 µl des so gewonnenen Zelllysats wurden mit 5 ml H₂O und 5 ml Fluoreszenzflüssigkeit versetzt. Die Radioaktivität des in Zellprotein eingebauten S^[35]-Methionin wurde anschließend mit einem β-Counter (Firma Beckman Coulter, Krefeld) bestimmt und in Relation zur gesamten Proteinmenge der Zellen (gemessen nach Bradford) gesetzt.

2.3.3 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Bei dieser Methode werden Proteinkonzentrationen photometrisch quantitativ bestimmt. Der Proteinprobe wird der Farbstoff Coomassie brilliant blue G250

zugesetzt, der an das Protein bindet und konzentrationsabhängig in seinem Absorptionsspektrum von 470 nm auf 595 nm umschlägt. 1 µl der Proben mit 9 µl Aqua dest. wurden mit 8 ml 20% Bradford-Lösung vermischt und ausgewertet. Außerdem wurden Proteinstandards von 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25 und 0,125 mg/ml vermessen. Anhand der so ermittelten Geraden konnte der Proteingehalt der Proben errechnet werden.

2.4 Detektion von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* mittels BRET

Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET) ist eine biophysikalische Technik zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen (PPI) in der lebenden Zelle (*Pfleger und Eidne, 2006*). Dabei macht man sich die strahlungsfreie Energieübertragung zunutze, die von einem Donorprotein (z.B. *Renilla* Luciferase) auf ein Akzeptorprotein (z.B. Yellow Fluorescent Protein) in Abhängigkeit von deren Abstand ($< 100 \text{ \AA}$) abgegeben wird (*Wu und Brand, 1994*). Die zu untersuchenden Proteine werden hierzu entweder mit dem Donorprotein oder dem Akzeptorprotein markiert, indem die cDNA, kodierend für die zu untersuchenden Proteine, in einem Plasmidvektor genetisch mit der cDNA, kodierend für die Markerproteine, fusioniert wird. Kommt es nach erfolgreicher Co-Transfektion der Plasmidvektoren und Expression der Fusionsproteine zu einer Interaktion der zu untersuchenden Proteine und einer damit einhergehenden Verringerung des Abstands zwischen den Markerproteinen, kann nach Oxidation eines Donor-spezifischen Substrates (z.B. Coelenterazin für *Renilla Luciferase*) die Energie in einem strahlungslosen Übergang von dem Donorprotein auf das Akzeptorprotein übertragen werden (Resonanz-Energietransfer). Das Donorprotein emittiert durch Substratumsatz Licht (Biolumineszenz), das Akzeptorprotein emittiert Licht nur nach erfolgtem Resonanz-Energietransfer. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *Renilla Luciferase* (Rluc) als Energie-Donor, *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) als fluoreszierenden Akzeptor und Coelenterazin als Rluc-spezifisches Substrat verwendet. Um die Anzahl falsch negativer Interaktionen durch eine räumliche Behinderungen der Interaktion oder eine Konformationsänderungen der zu untersuchenden Proteine durch die Markerproteine möglichst gering zu halten, wurden die beiden zu untersuchenden Proteine jeweils sowohl am N- wie auch C- Terminus mit Rluc bzw. YFP verbunden. Somit wurden für jedes zu untersuchende Protein vier verschiedene BRET-

Expressionsvektoren generiert, die in acht möglichen zu untersuchenden Markerprotein-Kombinationen für jedes Proteinpaar resultierten.

Die jeweilige cDNA von *PEX19-all* und *PEX19Δ2* wurde mit dem Gateway® Vector Conversion System (Invitrogen, Paisley, Großbritannien) per rekombinanter Klonierung in Expressionsvektoren integriert. Diese tragen die BRET-tags, die für die Fusionsproteine (Rluc und YFP) codieren, die sich dann am N- oder C-Terminus der zu untersuchenden Proteine befinden.

2.4.1 Gateway®-Klonierung

Einführung in die Methode

Die zur Untersuchung von PPI mittels BRET verwendeten Plasmidvektoren wurden mit der Gateway®-Technologie (Invitrogen, Paisly, Großbritannien) generiert. Diese basiert auf dem Rekombinationssystem des Bacteriophagen Lambda (λ), das DNA-Moleküle in das *E. coli*-Chromosom einfügt, damit diese von dem Bakterium kloniert werden. Anschließend wird das Plasmid wieder aus dem *E. coli*-Chromosom herausgeschnitten und steht somit zur weiteren Verwendung zur Verfügung.

In einem ersten Schritt werden hierbei die kodierenden Sequenzen der zu untersuchenden Proteine mittels konventioneller PCR amplifiziert und am 5'- und 3'-Ende mit spezifischen Bindungsstellen (attachement (*att*) sites) versehen. Diese dienen in der folgenden ersten Rekombinationsreaktion (BP) der Erkennung durch das λ -Rekombinationssystem.

Hierbei erfolgt im Rahmen der „Lysogenic“-Reaktion (Abbildung 9) der Lambda-Rekombination das Einfügen der cDNA in einen Donor-Vektor: *attB*₁ und *attB*₂ flankiert die beiden Enden des PCR-Produkts, *attP*₁ und *attP*₂ die Enden des Donor-Vektors (z.B. pDONR™ 221). Hier bindet das Rekombinationsprotein (BP Clonase™ enzyme mix). Die λ -Integrase führt die Zielregionen zueinander, zerschneidet sie und bindet sie schließlich kovalent aneinander. Die Gen-Sequenz des Donor-Vektors, die dabei durch das PCR-Produkt ersetzt wird (*ccdB*-Sequenz), kodiert für ein Protein, das mit der bakteriellen Gyrase interferiert und damit im Sinne einer negativen Selektion das Wachstum derjenigen Klone hemmt, die ungeladene Vektoren aufgenommen haben. Der Donor-Vektor (pDONR™ 221) trägt zudem Resistenzen gegen Kanamycin und Chloramphenicol, um eine selektive Zellkultur zu ermöglichen.

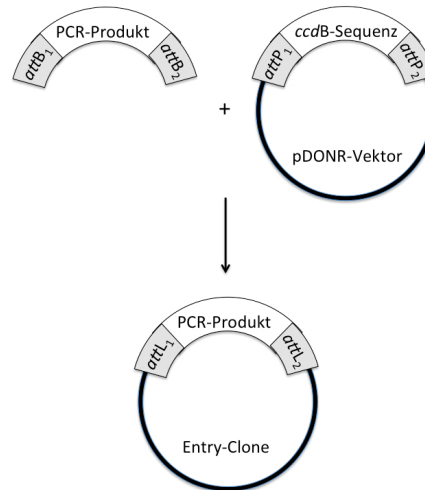


Abbildung 9 Lysogenic Reaktion mit dem pDONR-Vektor. Das mit *attB*₁ und *attB*₂ flankierte PCR-Produkt wird durch die „Lysogenic“-Reaktion kovalent an den Donor-Vektor gebunden und ersetzt gleichzeitig die *ccdB*-Sequenz, die die Resistenz des *E. coli* aufheben würde. Produkt der Reaktion ist der Entry-Clone (Quelle: Invitrogen).

Durch BP-Reaktion wurden Entry-Clones für alle zu untersuchenden Gene kloniert. Diese weisen die attachment sites *attL*₁ und *attL*₂ auf, die als Bindungsstellen für den nächsten Schritt, die „Lytic“-Reaktion (LR Clonase™ enzyme mix) dienen, bei der der Ziel-Strang mittels Excisionase (Xis) herausgeschnitten und mit den attachment sites *attR*₁ und *attR*₂ des Destinations-Vektors verbunden wird (Abbildung 10). Dieser Destination Vektor enthält bereits die kodierende Sequenz der BRET Markerproteine (Rluc oder YFP N- oder C-terminal), so dass BRET-Expressionsvektoren resultieren. Die BRET-Destination Vektoren lagen bereits vor (Gersting, 2012)

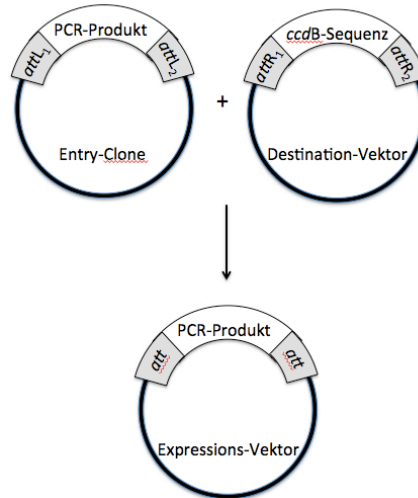


Abbildung 10 Darstellung der Lytic-Reaktion. Durch die „Lytic“-Reaktion wird der Zielstrang aus dem Entry-Clone geschnitten und an den Destinations-Vektor mit den Bindungsstellen für die BRET Markerproteinen gebunden. Produkt der Reaktion ist der Expressionsvektor (Quelle: Invitrogen).

In folgender Arbeit wurden die Sequenzen von *PEX19-all*, *PEX19Δ2*, *ABCD3* (BC009712), *PXMP2* (BC073997), *ABCD1* (BC015541), *PEX26* (NM_001127649.1) und *ABCD2* (BC104903) zunächst mittels PCR amplifiziert und per BP-Reaktion in pDONR-Vektor221 kloniert. Die kodierenden Sequenzen von *PEX16* (BC004356), *PXMP4* (BC001147), *SCL25A17* (BC005957), *PEX12* (BC031085), *PEX3* (BC015506), *PEX14* (BC006327), *PEX11B* (BC011963), *PEX10* (NM_002617.3), *PXMP3* (BC005375), *PEX13* (BC067090) und *FIS1* (BC003540) konnten bereits als Entry-Vektoren aus einer Kopie der Mammalian Gene Collection (MGC) oder aus der PlasmID Database (Harvard Medical School) bezogen werden.

Protokoll der Klonierung

Die Primer, die zur Amplifizierung der für die Gateway®-Klonierung verwendeten Gensequenz benutzt wurden (Tabelle 4), enthielten jeweils die erforderlichen Attachments *attB*₁ und *attB*₂ (25 bp) sowie 18–25 bp der Sequenz des Templates.

| Primer | Sequenz |
|---------------------------|---|
| PEX19-attB1-for | 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACACCATGG CCGCCGCTG AGGAAG-3' |
| PEX19-attB2-rev | 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCATGATCA GACACTGTT CACCACTG-3' |
| PEX19deltaExon2-attB1-for | 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACACCATGA AGGAGTTGG CT GAGGAAGAAC-3' |
| PEX19deltaExon2-attB2-rev | 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCATGATCA GACACTGTTC AC CACTG-3' |
| ABCD1-attB1-for | 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGACATGCC GGTGCTCTCCA GGCC-3' |
| ABCD1-attB2-rev | 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAATTCCGG TGGAGGCACCC TGGAGG-3' |
| ABCD2-attB1-for | 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATACCATGA CACATATGCTAA ATGCAG-3' |
| ABCD2-attB2-rev | 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATGCCACA AAATTTTCCAA GTACC-3' |
| PEX26-attB1-for | 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTATGAAGA GCGATTCTTCGA CCTCTGCAGCC-3 |
| PEX26-attB2-rev | 5'-GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGTCACGGAT GCGGAGCTGG TAG-3' |
| ABCD3-attB1-for | 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATACCATGG CGGCCTTCAGC AAG-3' |
| ABCD3-attB2-rev | 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAGATGTCT CATCTTCATTTT AATTG-3' |
| PXMP2-attB1-for | 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATACCATGG CGCCGGCCGC GTCCAG-3' |
| PXMP2-attB2-rev | 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTTCCCCA AGGAGGCCAGG TAGGC-3' |

Tabelle 4 Verwendete Primer für die präparative und Real-Time RT-PCR. *T_m* zeigt die Schmelztemperatur

Die Amplifizierung der cDNA erfolgte mittels konventioneller PCR mit der KAPA Hifi Polymerase (Peqlab). Hierbei wurde entsprechend dem Protokoll und den Empfehlungen des Herstellers vorgegangen. Die Konzentrationen der linearen *attB*-Substrate wurden mittels Ultraviolettabsorptionsspektroskopie (Nanotrop) bestimmt.

Für die anschließende BP-Reaktion wurden bei einem Reaktionsvolumen von 5 µl 150 ng des pDONR™-Vektors mit 50 fmol des PCR-Produkts eingesetzt.

Mit folgender Formel wurde die jeweilige Menge in Nanogramm ermittelt:

$$\text{DNA-Menge [ng]} = \text{Ziel-Menge [fmol]} \times \text{Basenlänge} \times (660 \text{ fg / fmol}) \times (1 \text{ ng} / 10^6 \text{ fg})$$

Die verschiedenen Komponenten wurden in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß bei Zimmertemperatur suspendiert.

| Komponenten | Probe |
|----------------------------|-------------|
| attB-PCR-Produkt (50 fmol) | Nach Formel |
| pDONR™-Vektor (150 ng/µl) | 1 µl |
| H2O | Auf 4 µl |

Anschließend wurde 1 µl BP Clonase™ II enzyme-mix zu den Proben gegeben und bei 25°C für 2 std inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde 1 µl Proteinase-K-Lösung hinzugefügt und der Ansatz für 10 min bei 37°C inkubiert. Es folgte die Transformation in chemisch kompetente *E. coli* (DH5a-Zellen).

Hierzu wurden 12,5 µl chemisch kompetente *E. coli* (DH5α-Zellen) in 0,2 ml-Reaktionsgefäßen auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1 µl des BP-Rekombinationsansatzes vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden nun für 90 sek einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und anschließend 2 min auf Eis gekühlt. Zu jedem Reaktionsgefäß wurden 50 µl LB (37°C) gegeben, dann wurde vorsichtig für eine Stunde bei 37°C mit 225 rpm horizontal geschüttelt. 50 µl jeder Transformation wurden nun auf einem Well auf einer vorgewärmten, selektiven 12-well Agar-Platte mit Kanamycin 50 µg/ml verteilt und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Die anschließende DNA-Isolierung und Purifikation erfolgte gemäß dem Protokoll des mini prep Kits (QUIAGEN, Hilden) und des Purifikation-Kits (QUIAGEN, Hilden). Zur Kontrolle führten wir folgend eine Sequenzanalyse bei Eurofins MWG operon (www.eurofinsdna.com) mit im Vektor bereits enthaltenen Standard-Primern M13uni und M13rev durch.

Im Anschluss folgte die Rekombination der in den Entry-Vektoren enthaltenen Gene in die jeweiligen BRET-Expressionsvektoren. Hierbei wurde jedes Gen in vier

unterschiedliche BRET-Vektoren rekombiniert, die jeweils am 5'- oder 3'-Ende der Rekombinationsstelle die kodierende Sequenz von Rluc oder YFP enthalten.

Zur Herstellung der BRET-Expressionsvektoren mittels der LR-Rekombinations-Reaktion wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Komponenten ebenfalls bei Zimmertemperatur in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß suspendiert, das Reaktionsvolumen betrug 4 µl.

| Komponente | Probe |
|-------------------------|-------|
| Entry-Klon (150 ng/µl) | 1 µl |
| DEST-Vektor (150 ng/µl) | 1 µl |
| H ₂ O | 2 µl |

LR Clonase™ enzyme mix wurde auf Eis aufgetaut. Jeder Probe wurde 1 µl zugefügt und erneut gevortext. Die Reaktion wurde 1 std bei 25°C inkubiert. 1 µl Proteinase K Lösung wurde dazugegeben und der Ansatz für 10 min bei 37°C erneut inkubiert. Die Transformation der LR-Reaktion in chemisch kompetente Zellen (DH5alpha) erfolgte erneut entsprechend dem vorbeschriebenen Protokoll. Im Anschluss an die Aufreinigung der DNA mittels Mini Prep Kit (Qiagen) wurde der Erfolg der LR-Reaktion mittels Restriktionsverdau durch das Enzym *SaI* (Fermentas) verifiziert. Nach erfolgreicher LR-Reaktion wurden nun nochmals Bakterienkulturen aus den Glycerinstocks angesetzt (in 300 ml LB-Medium bei 37°C über Nacht), um so entsprechend hohe DNA-Mengen zu gewinnen. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem Maxi-Kit von Promega (Pure-Yield Maxi-Prep Kit, Promega, Madison, USA) mit anschließender Konzentrationsbestimmung. Die Konzentrationen lagen durchschnittlich bei 1 µg/µl mit einer Ausbeute von jeweils 600 µg.

2.4.2 Zellkultur und Transfektion

Die Co-Transfektion der Plasmidvektoren in HEK293 Zellen für die BRET-Experimente erfolgte durch Elektroporation mittels des 96-well Nucleofector II Device (Lonza, Köln). Die Nucleofektion ist eine besonders effektive Form der Elektroporation, wobei die Zellmembran durch Spannungspulse für die DNA permeabel gemacht wird und somit DNA nicht viral direkt in den Zellkern transportiert wird (Gresch, 2004; Hamm 2002).

Hierzu wurden zunächst zehn Millionen HEK293-Zellen bei 37°C und 5% CO₂ über eine Woche in einer HYPERFlask (Corning, New York, USA) Zellkulturflaschen kultiviert. Als Medium diente DMEM (PAA, Pasching, Österreich), das mit 10% fetalem bovinen Serum (FCS GOLD, PAA, Pasching, Österreich) und 1% antibiotisch-antimykotischer Lösung (entsprechend 100 Units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 0,25 µl/ml Amphotericin B, PAA, Pasching, Österreich) ergänzt wurde. Die Transfektion erfolgte nach Trypsinisierung und Zellzählung (Neubauer-Zählkammer) im Amaxa 96-well Nucleofection device (Lonza, Köln) mit jeweils 4×10^5 Zellen, 0,8 µg Plasmid-DNA und 20 µl Nukleofektionslösung aus dem SE Cell Line 96-well Nucleofector™ Kit (Lonza, Köln). Das Verhältnis der Expressionsvektoren von Akzeptor (YFP) zu Donor (Rluc) bei zwei zu untersuchenden Proteinen lag bei 3:1, also 0,6 µg und 0,2 µg pro well. Hierbei wurden jeweils alle 8 Tag-Kombinationen in Duplikaten und zwei unabhängigen Experimenten untersucht. Zudem wurden auf jeder Platte folgende Kontrollen jeweils in doppeltem Ansatz durchgeführt: Als Positiv-Kontrolle ein Plasmidvektor kodierend für ein Fusionsprotein von Akzeptor (YFP) und Donor (Rluc), als Negativ-Kontrolle der Expressionsvektor kodierend für das Donor-(Rluc)-Fusionsprotein ohne den Expressionsvektor kodierend für den Akzeptor (YFP) und schließlich nicht-transfizierte Zellen als Kontrolle für das Hintergrundsignal. Hierzu wurde in einem ersten Schritt die DNA in 96-well V-Bodenplatten vorgelegt: 0,2 µg des Donor-Vektors und 0,6 µg des Akzeptor-Vektors unter Einhaltung eines Faktors 1,33 für das Totvolumen $\times 2$ für Duplikate. Folgend wurden die trypsinierten Zellen bei 200 g für 5 min pelletiert und anschließend in der Nukleofektionslösung resuspendiert. In entsprechender Anzahl wurden dann Lösungen mit Zellen (4×10^5 Zellen, multipliziert $\times 2$ für Duplikate sowie dem Totvolumen-Faktor von 1,33) zur DNA gegeben und gemischt. Hiervon wurden anschließend je 20 µl in ein well der Nukleofektionsplatte übertragen. Es folgte die Nukleofektion im Amaxa Shuttle mit dem Programm DS-130. Nach Beendigung des Programms wurden je 80 µl DMEM ohne Phenolrot (PAA, Pasching, Österreich) dazugegeben und hiervon 50 µl in eine weiße 96-well Platte übertragen und bei 30°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.4.3 Detektion des BRET-Signals

48 Stunden nach der Transfektion wurde das BRET-Signal in einem Luminometer (LUMIstar OPTIMA, BMG LABTECH, Offenburg) detektiert. Hierzu wurde

Coelenterazin wie folgt vorbereitet: 1 mg Coelenterazin wurde in 1 ml Methanol aufgelöst, anschließend wurde die 300 µM Coelenterazin-Lösung mit 127 µl Coelenterazin native (PJK, Kleinbittersdorf) und 1000 µl Renilla assay Puffer (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) angelegt und direkt vor der Messung mit 6,6 ml PBS (PAA, Pasching, Österreich) verdünnt. Aus der 96-well-Platte wurden pro well 165 µl Medium abgenommen. Die Messung erfolgte nach Injektion von 70 µl Coelenterazin-Lösung sowie nach 2 min Inkubation je über 10 sek bei 485 nm (Rluc-Signal) und bei 535 nm (BRET-Signal).

2.4.4 Berechnung der BRET-Ratio

Die BRET-Ratio beschreibt das Verhältnis von detektiertem Resonanz-Energie-Transfer (535 nm) zu detektiertem Lumineszenzsignal der Luciferase (485 nm). Eine Berechnung der BRET-Ratio erfolgte nur bei Rluc-Signalen, die über dem Neunfachen der Standardabweichung vom Mittelwert der nicht transfizierten Zellen lagen. Die Berechnung der BRET-ratio erfolgte nach der Formel:

$$R = I_A/I_D - cf$$

R ist die BRET-Ratio, I_A die Stärke der Licht-Emission bei 535 nm, I_D die Stärke der Licht-Emission bei 485 nm und cf der Korrelationsfaktor ($535_{\text{control}}/485_{\text{control}}$) für die Nullproben (Transfektionen mit Donor-Fusions-Protein ohne Akzeptor-Protein).

Die Positiv-Kontrolle mit dem YFP-Rluc-Fusionsprotein sollte eine BRET-Ratio von ungefähr 1,0 erreichen. Eine Interaktion zwischen zwei Proteinen kann angenommen werden, wenn zumindest eine der 8 untersuchten tag-Kombinationen eine BRET-Ratio ergibt, die über dem spezifischen Schwellenwert von 0,094 liegt (*Gersting, 2012*).

3 Ergebnisse

3.1 Quantifizierung der Splicevarianten PEX19 und PEX19 Δ 2 mittels Real-Time RT-PCR

Die Splicevarianten PEX19 und PEX19 Δ 2 wurden aus cDNA und aus Patientenproben quantifiziert, um zu untersuchen, ob und in welcher Menge die Splicevarianten in relevanter Menge in den verschiedenen Organen vorkommen.

3.1.1 Überprüfung der Spezifität der Primerpaare

Als Voraussetzung für eine zuverlässige Quantifizierung der Splicevarianten wurde die Spezifität der verwendeten Primerpaare (PEX19wtEx1/3 *for/rev*; PEX19 Δ Ex2 *for/rev*; GAPDH *for/rev*) nach jeder in dieser Arbeit durchgeführten Real-Time PCR überprüft.

Der *realtime Cycler* bietet die Möglichkeit, nach jedem analytischen Versuch eine Schmelzkurve des PCR-Produkts anzufertigen. Diese wird vom Programm in Form eines Graphen dargestellt. Der Wendepunkt, der durch eine Gerade markiert wird, zeigt den Reaktionszeitpunkt an, an dem die Fluoreszenzstärke maximal zunimmt. Dieser Zeitpunkt ist gleichzusetzen mit der Reaktionstemperatur, bei der sich die amplifizierten DNA-Einzelstränge wieder zu Doppelsträngen zusammenlagern. Diese Schmelztemperatur ist je nach Länge und Guanin/Cytidin-Anteil unterschiedlich und damit relativ spezifisch für das jeweilige Amplifikat.

Die Software des verwendeten Gerätes erlaubt eine Darstellung der ersten Ableitung des Graphen der Schmelzkurve, was die Bestimmung des Wendepunktes erleichtert. Die errechneten Schmelztemperaturen lagen bei 88,0°C für GAPDH *for/rev*, 86,0°C für PEX19wtEx *for/rev* und 84,0°C für PEX19 Δ Ex2 *for/rev*. Die Spezifität der Primerpaare wurde jeweils dadurch angezeigt, dass die Maxima (Wendepunkte in der ursprünglichen Funktion) steil und allein stehend waren und den errechneten Temperaturwerten entsprachen. In Abbildung 11 werden die Schmelzkurven von jeweils 36 Replikaten pro Primerpaar aus den zur Berechnung der Standardkurven erfolgten Messungen dargestellt. Als Template diente die von S. Kammerer zur Verfügung gestellte cDNA bzw die im Rahmen dieser Arbeit klonierte Plasmid-DNA.

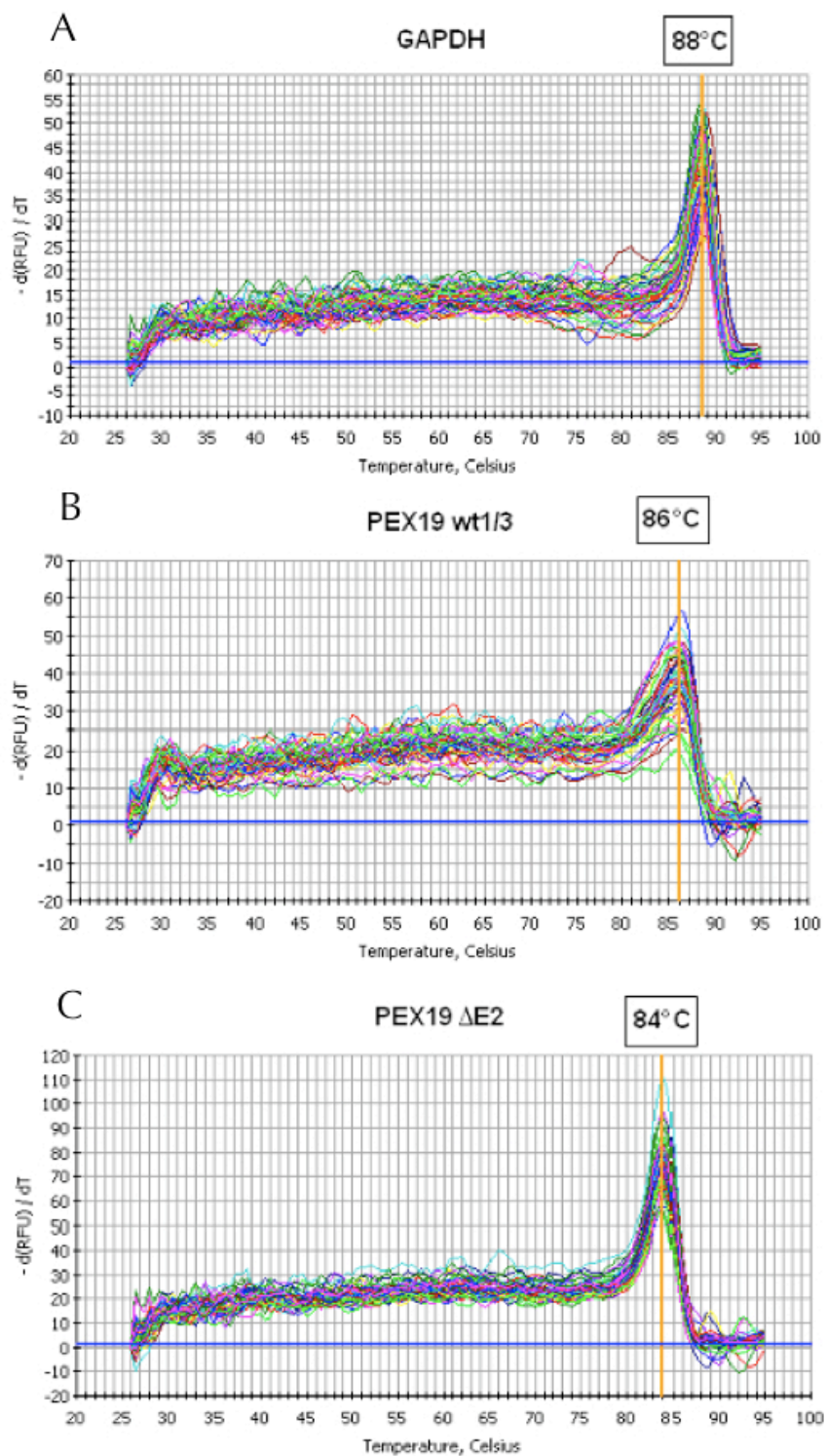


Abbildung 11 Durch den iCycler errechnete erste Ableitungen der Schmelzkurven der Primerpaare **(A)** GAPDH *for/rev*, **(B)** PEX19wtEx1/3 *for/rev* und **(C)** PEX19 Δ Ex2 *for/rev*. Angezeigt werden auf der X-Achse die Temperatur in °C und auf der Y-Achse die Veränderung der Fluoreszenzstärke als Funktion der Zeit. Die jeweilige Schmelztemperatur wird mit der gelben, senkrechten Linie durch das Maximum der Graphen markiert.

Die PCR-Produkte wurden anschließend alle zusätzlich mittels Agarosegel DNA-Elektrophorese ausgewertet. Dabei wird ihre Länge analysiert und Verunreinigungen durch zusätzlich synthetisierte DNA-Stränge detektiert. Es wurde im Vorfeld in vierfacher Ansatz die von S. Kammerer zur Verfügung gestellte *PEX19*-cDNA mit den Primerpaaren *PEX19wtEx1/3 for/rev* und *PEX19ΔEx2 for/rev* analysiert. Das Primerpaar *GAPDH for/rev* wurde mit der von der Firma Stratagene bezogenen cDNA menschlicher Leber analysiert. Die Auswertung erfolgte in einem dreiprozentigen Agarosegel. In der ersten Spalte wurde ein 500-kb Größenmarker aufgetragen. Die jeweiligen Banden entsprachen den zu erwartenden Größen (*PEX19wtEx1/3*: 136 Basenpaare; *PEX19ΔEx2*: 134 Basenpaare; *GAPDH*: 132 Basenpaare). In allen Ansätzen fanden sich keine Verunreinigungen des Agarosegels als Zeichen weiterer, unspezifischer Produkte. Somit kann von einer spezifischen Bindung der Primerpaare ausgegangen werden (Abbildung 12).

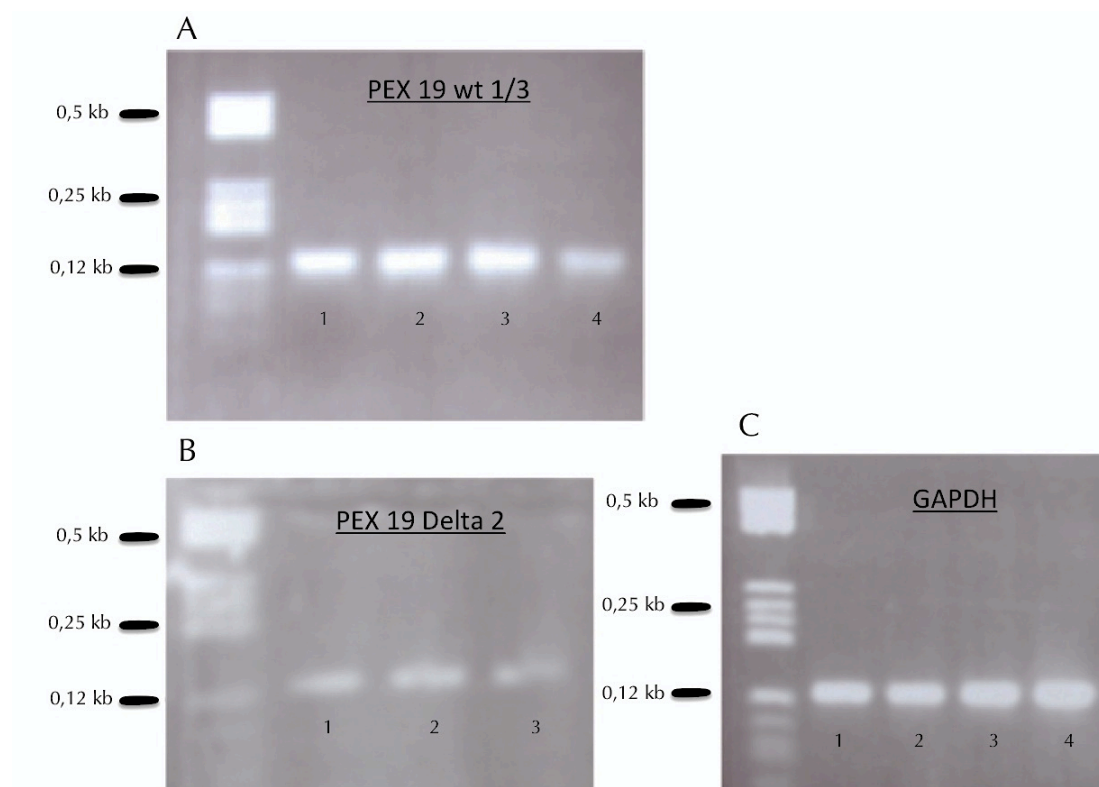


Abbildung 12 Fotos der horizontalen DNA-Gelelektrophorese der mit dem Primerpaar *PEX19wtEx1/3 for/rev* (A), *PEX19ΔEx2 for/rev* (B) und *GAPDH for/rev* (C) quantifizierten Produkte. In der linken Spalte ist der Größenmarker angegeben, die mit den Ziffern 1-4 bzw 1-3 angegebenen Banden entsprechen den jeweiligen PCR-Produkten.

3.1.2 Effizienz der Real-Time PCR

Um die Ergebnisse der absoluten Quantifizierung miteinander vergleichen zu können, wurde die Effizienz der Real-Time PCR für jedes Primerpaar in sechs parallelen Versuchsansätzen in den Verdünnungsstufen 1×10^{-4} bis 1×10^{-9} µg der jeweiligen cDNA pro ml in dreifachem Ansatz ermittelt. Die Ergebnisse wurden mit der Software des iCyclers ausgewertet und als Standardkurve dargestellt (Abbildung 13).

Die Korrelationskoeffizienten lagen bei 0,998 für GAPDH *for/rev*, bei 0,991 für PEX19 *for/rev* und bei 0,997 für PEX19Δ2 *for/rev*. In der Literatur werden Werte über 0,990 für aussagekräftige Standardkurven als Zeichen für die Genauigkeit der Verdünnungsreihe und der Versuchsanordnung verlangt (Bustin 2000). Die errechneten Funktionen zu den Graphen lauten:

$$\text{GAPDH } for/rev: y = -3,827 x + 0,079$$

$$\text{PEX19wtEx1/3 } for/rev: y = -4,322 x - 2,587$$

$$\text{PEX19ΔEx2 } for/rev: y = -3,686 x + 2,015$$

Die Funktion der Kurven erlaubt es, Rückschlüsse auf die PCR-Effizienz der Versuchsanordnung zu ziehen, die durch das iCycler-Programm ebenfalls errechnet wurden: GAPDH *for/rev*: 82,5%, PEX19wtEx1/3 *for/rev*: 70,4%, PEX19ΔEx2 *for/rev*: 86,8%. Somit zeigten alle drei Real Time-PCR-Ansätze einen guten Korrelationskoeffizienten und gute und vergleichbare Effizienz. Die Real Time-PCR-Ansätze für PEX19wtEx1/3 *for/rev* und für PEX19ΔEx2 *for/rev* konnten folgend zur absoluten Quantifizierung verwendet werden, der Real Time-PCR-Ansatz für GAPDH *for/rev* diente als housekeeping gene zur relativen Quantifizierung.

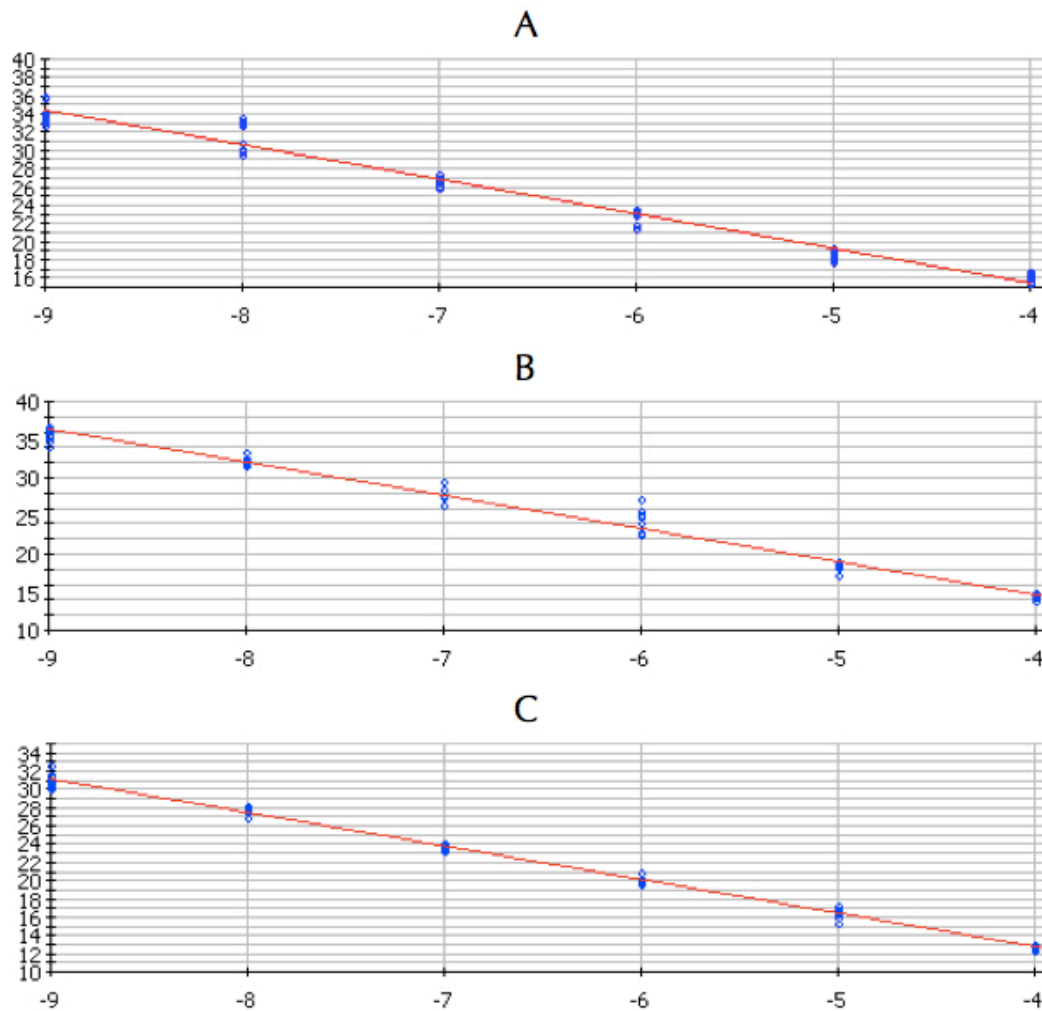


Abbildung 13 Graphische Darstellung der Standardkurven der in dieser Arbeit verwendeten Primerpaare (A) GAPDH *for/rev*, (B) PEX19wtEx1/3 *for/rev* und (C) PEX19ΔEx2 *for/rev*. Angezeigt werden auf der X-Achse die Verdünnungsstufe in Zehnerpotenz-Schritten aufsteigend von links nach rechts, auf der Y-Achse der entsprechende Ct-Wert. Die blauen Kreise entsprechen den sechs einzelnen Messwerte (Standards) pro Verdünnungsstufe und Primerpaar. Der Graph der Funktion ist als rote Gerade abgebildet.

3.1.3 Absolute Quantifizierung aus *human first strand* cDNA

Anhand von RT-PCR-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Splicevariante *PEX19Δ2* relevant in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden konnte, im Uterus konnte dabei eine Umkehr des quantitativen Verhältnisses zu Volllänge-*PEX19* gefunden werden (S. Kammerer, 1997). Ziel dieser Arbeit war es, die Kopienzahl der Splicevariante im Vergleich zur Volllänge-*PEX19* in verschiedenen Geweben zu quantifizieren, um möglicherweise Rückschlüsse auf spezifische Regulationsmechanismen der Expression von *PEX19Δ2* und damit auf eine mögliche

Funktion in der frühen peroxisomalen Biogenese ziehen zu können. Hierzu wurden Real-Time PCR-Analysen an einer *human first strand* cDNA-Datenbank von Organen kaukasischer Probanden der Firma Stratagene (Amsterdam) durchgeführt und die Kopienzahl von *PEX19-all* und *PEX19Δ2* absolut quantifiziert. Zur absoluten Quantifizierung der Kopienzahl wurden die jeweils ermittelten Ct-Werte für *PEX19-all* bzw. *PEX19Δ2* in die Funktion der entsprechenden Standardkurve eingesetzt (siehe Abschnitt 3.1.2). Die so ermittelte Menge an eingesetztem Template konnte dann auf die Kopienzahl umgerechnet werden (Abbildung 14).

Beide Varianten konnten in allen ausgewerteten Organen (Uterus, Lunge, Leber, Niere, Hirn, Cervix) nachgewiesen werden. *PEX19-all* war in allen Organen in höherer Kopienzahl nachweisbar, zeigte jedoch signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Organen. Sie kam in der cDNA-Probe aus dem Uterus mit einer absoluten Kopienzahl von $1,296\text{E}+008$ vor. Entsprechende Kopienzahlen zeigten sich in der cDNA-Probe der Leber ($1,422\text{E}+008$). Signifikant geringere Kopienzahlen von *PEX19-all* im Vergleich zur Uterus-Probe wurden dagegen in den cDNA-Proben von Niere ($1,128\text{E}+008$, $P < 0,05$), Lunge ($7,102\text{E}+007$, $P < 0,001$) und Hirn ($7,973\text{E}+007$, $P < 0,001$) gefunden. Auch in der cDNA-Probe der Cervix ($1,128\text{E}+008$) wurde *PEX19-all* in geringerem Maße als im Uterus exprimiert, aufgrund der größeren Standardabweichung der einzelnen Messwerte konnte dies jedoch nicht als signifikant gewertet werden.

PEX19Δ2 wurde in den cDNA-Proben der verschiedenen Organe in folgenden Mengen nachgewiesen: Im Uterus ($5,643\text{E}+007$) fanden sich signifikant höhere Kopienzahlen als in Leber ($3,860\text{E}+007$, $P < 0,001$), Lunge ($4,420\text{E}+007$, $P < 0,01$), Hirn ($3,280\text{E}+007$, $P < 0,001$) und Cervix ($3,756\text{E}+007$, $P < 0,001$). Eine dem Uterus entsprechende Kopienzahl der Splicevariante fand sich in der cDNA-Probe der Niere ($6,463\text{E}+007$).

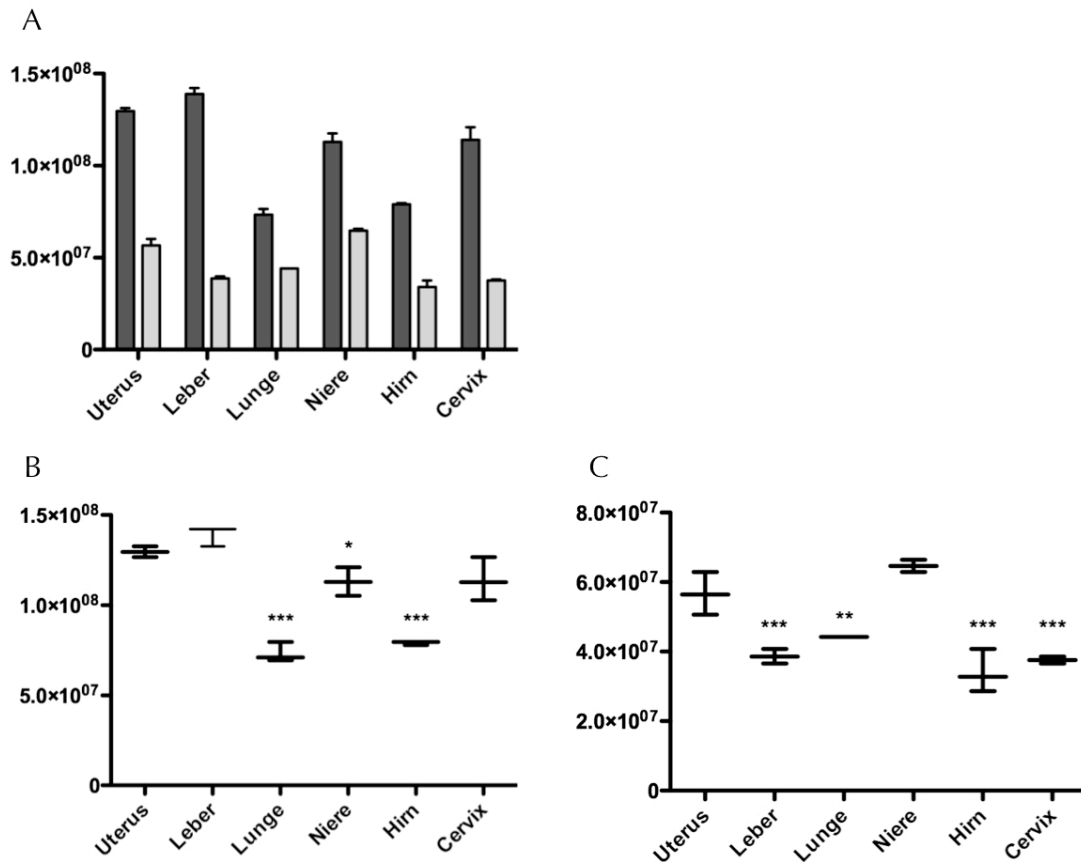


Abbildung 14 Absolute Quantifizierung von *PEX19-all* und *PEX19Δ2* an humaner first strand cDNA. First strand human cDNA wurde mit dem iCycler vermessen. Abgebildet sind die absoluten Kopienzahlen der Splicevarianten: (**A**) *PEX19-all* (dunkle Säulen) und *PEX19Δ2* (helle Säulen), sowie in weiteren Diagrammen jeweils einzeln die Kopienzahlen von *PEX19-all* (**B**) bzw. *PEX19Δ2* (**C**). Der breite Balken zeigt hier den Median der Messungen an, die beiden schmalen die jeweilige 25. und 75. Perzentile. Bei signifikant verminderter Kopienzahl entsprechen die mit * gekennzeichneten Balken einer Signifikanz von $P < 0,05$, für ** gilt $P < 0,01$ und für *** $P < 0,001$.

Betrachtet man nun das Verhältnis von Volllänge-*PEX19* zur Splicevariante *PEX19Δ2*, zeigte sich eine geringere Expression von *PEX19Δ2* in allen Organen. Bei einem Verhältnis von *PEX19-all*/*PEX19Δ2* von 1,66 bzw. 1,75 errechnete sich für Lunge und Niere der höchste relative Anteil der Splicevariante. In der cDNA-Probe vom Uterus lag das Verhältnis bei 2,29, für das Hirn bei 2,32. Dagegen haben wir beobachtet, dass insbesondere in der Leber (3,6) und in der Cervix (3,06) ein deutlich geringerer Anteil der Splicevariante exprimiert wird (Abbildung 15).

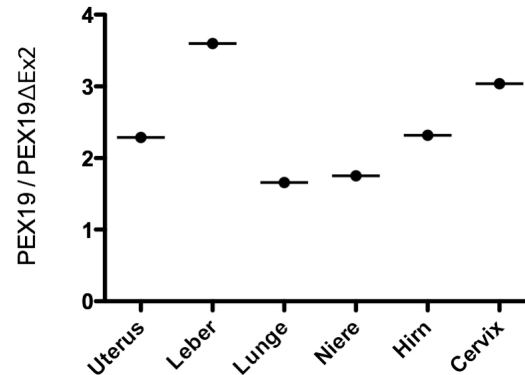


Abbildung 15 Verhältnis der Splicevarianten *PEX19-all* und *PEX19Δ2* in den verschiedenen Organproben der human first strand cDNA. Es wird der Faktor der Kopienzahlen nach absoluter Quantifizierung von *PEX19-all* zu *PEX19Δ2* angegeben.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass sowohl der *PEX19*-Wildtyp als auch die *PEX19Δ2*-Splicevariante in diversen Geweben in unterschiedlicher Menge vorkommt. Für den Uterus konnte gezeigt werden, dass *PEX19Δ2* hier in verhältnismäßig hohen Mengen exprimiert wird, allerdings nicht in dem nach der Arbeit von S. Kammerer bisher angenommenen höherem Maße als *PEX19-all*. Darüber hinaus wird *PEX19Δ2* in Lunge, Niere und Hirn ebenfalls in recht hoher Menge exprimiert.

3.1.4 Absolute Quantifizierung aus Gewebeproben

In einem weiteren Schritt wurden die Splicevarianten in Gewebeproben quantifiziert. Hierbei wurde von vier Probandinnen jeweils mRNA aus den Organen Uterus, Leber, Lunge, Niere und Colon isoliert und mittels Real-Time RT-PCR mit dem iCycler ausgewertet. Entsprechend der Auswertungen aus der *human first strand* cDNA erfolgte eine absolute Quantifizierung anhand der ermittelten Standardkurven (Abbildung 16).

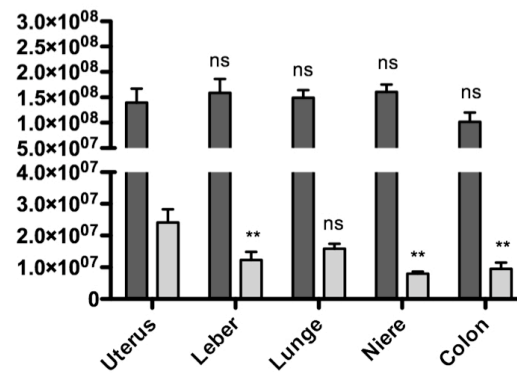


Abbildung 16 Absolute Quantifizierung von *PEX19-all* und *PEX19Δ2* aus den Organproben der Probandinnen. Abgebildet sind die gemittelten Werte der absoluten Kopienzahlen der Splicevarianten *PEX19-all* (graue Säule) und *PEX19Δ2* (weiße Säule) aus den Organen der vier Probandinnen. Signifikant geringere Werte für *PEX19Δ2* in den Organen Leber, Lunge, Niere und Colon im Vergleich zum Uterus werden mit ** ($P < 0,01$) markiert, „ns“ steht für nicht signifikant ($P > 0,05$) bei zu hoher Standardabweichung der Messwerte.

In allen untersuchten Gewebeproben konnten beide Splicevarianten nachgewiesen werden. *PEX19-all* war unabhängig von den Probandinnen die in höherer Menge vorkommende Variante. In dem zusammenfassenden Diagramm aller vier Probandinnen zeigt sich eine entsprechende Verteilung von *PEX19-all* in den Organen Uterus ($1,672\text{E}+008$), Leber ($1,090\text{E}+008$), Lunge ($1,489\text{E}+008$) und Niere ($1,495\text{E}+008$) ($P > 0,05$).

Werden die Kopienzahlen von *PEX19Δ2* der verschiedenen Probandinnen betrachtet, so fällt auf, dass sich die Splicevariante im Uterus ($2,569\text{E}+007$, $P < 0,01$) signifikant häufiger nachweisen lässt als in den Proben von Leber ($1,022\text{E}+007$), Niere ($6,799\text{E}+006$) und Colon ($6,440\text{E}+006$). Die hohe Streuung der Werte für die Lunge ($1,667\text{E}+007$) lässt keine Aussage über einen signifikanten quantitativen Unterschied im Vergleich zum Uterus zu.

Betrachtet man das organspezifische, quantitative Verhältnis der beiden Splicevarianten in den Gewebeproben der Patientinnen, so könnten folgende Aussagen getroffen werden: Im Uterus konnte ein mittleres Verhältnis von *PEX19-all* zu *PEX19Δ2* von 4,56 (SD 2,38) errechnet werden. Mit einem mittleren Verhältnis von 20,05 (SD 0,59) zeigte

sich in der Niere ein signifikant höheres Verhältnis von *PEX19-all* zu *PEX19Δ2* im Vergleich zum Uterus ($P < 0,0125$). Auch im Colon zeigte sich im Vergleich zum Uterus ein höheres Verhältnis mit einem mittleren Wert von 10,84 (SD 1,047, $p < 0,0166$). Der Quotient der Leber betrug 12,16 (SD 11,89), im Vergleich zum Uterus bedeutet das keinen signifikanten Unterschied ($P > 0,025$). Gleiches gilt für die Lunge mit einem Verhältnis von 10,63 (SD 6,575), was im Vergleich zum Uterus nicht signifikant ist ($P > 0,025$). Lunge und Leber zeigten jedoch eine hohe Streuung der Werte als möglichen Hinweis auf eine hohe Variabilität der mRNA-Expression in diesen stoffwechselaktiven Organen (Abbildung 17).

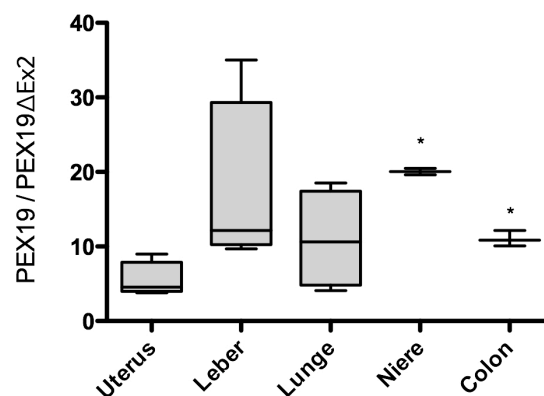


Abbildung 17 Verhältnis der Splicevarianten *PEX19-all* und *PEX19Δ2* in den verschiedenen Organproben der vier Patientinnen. Es wird der gemittelte Faktor der Kopienzahlen nach absoluter Quantifizierung von *PEX19-all* zu *PEX19Δ2* angegeben.

Zusammenfassend wird die Splicevariante *PEX19Δ2* im Verhältnis zu *PEX19-all* aus den Organproben der Probandinnen geringer exprimiert als in den human first strand cDNA-Proben, wobei der höchste Anteil von *PEX19Δ2* im Verhältnis zu *PEX19-all* im Uterus und nicht in der Niere nachweisbar ist.

3.2 Untersuchung der Regulierung von *PEX19Δ2* mittels NMD

PEX19Δ2 ist aufgrund des vorgezogenen Stopcodons („Premature Termination Codon“, PTC) für eine Regulation durch NMD („Nonsense Mediated RNA-Decay“) prädestiniert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Splicevariante in verschiedenen Geweben jeweils

zu einem hohen Anteil exprimiert wird. Um zu untersuchen ob, und wenn ja, in welchem Ausmaß die Splicevariante einem NMD unterliegt, wurde die Proteinbiosynthese und damit der NMD in primären, humanen Fibroblasten gehemmt und folgend mittels Real-Time RT-PCR die cDNA-Mengen von *PEX19Δ2* zu *PEX19-all* relativ quantifiziert. Von einer teilweisen Regulation durch NMD ist auszugehen, wenn es nach Hemmung der Proteinbiosynthese zu einem signifikanten Anstieg der cDNA der Splicevariante kommt oder diese im Verhältnis zum Volllänge-Protein signifikant ansteigt.

3.2.1 Translationshemmung mit Puromycin

In einem ersten Schritt wurde überprüft, ob eine ausreichende Hemmung der Proteinbiosynthese als Voraussetzung für die korrekte Versuchsdurchführung vorlag. In der Abbildung wird die Translationsaktivität der unbehandelten Zellen mit 100% angegeben. Nach Behandlung der Zellkultur mit Puromycin fiel dieser Wert auf 1% des Ausgangswertes ab. Somit konnte von einer effizienten Hemmung der Proteinsynthese und damit einer effizienten Hemmung des NMD ausgegangen werden (Abbildung 18).

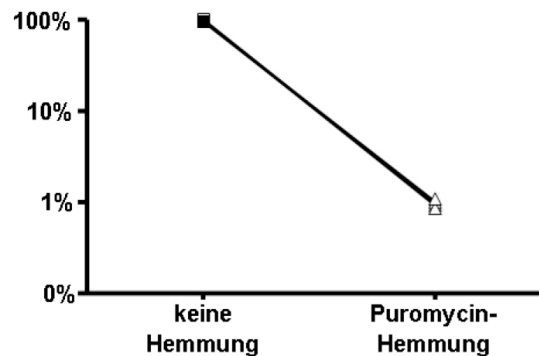


Abbildung 18 Translation-Hemmung mit Puromycin. Die Hälfte der im NMD-Hemmversuch verwendeten Fibroblasten wurde mit $S^{[35]}$ -Cystein in cysteinfreiem Medium markiert und mit dem Betacounter ausgewertet, parallel wurde die Proteinmenge pro μ l nach Bradford bestimmt

Vor und nach der Hemmung der Proteinbiosynthese wurde mit der aus den Fibroblasten isolierten RNA jeweils eine Real-Time RT-PCR durchgeführt. Die durch den iCycler ermittelten CT-Werte vor der Hemmung wurden als Bezugswert für die relative Veränderung der Expression von *PEX19Δ2* nach der Delta-Delta-Ct-Methode

(Livak 2001) auf 1 festgelegt. Hierbei diente das housekeeping gene GAPDH als interner Standard. Für den Real Time-PCR-Ansatz von GAPDH $_{for/rev}$ konnte zuvor mittels Verdünnungsreihe eine vergleichbare Effizienz und Korrelation wie für PEX19Ex1/3 $_{for/rev}$ und für PEX19 Δ Ex2 $_{for/rev}$ nachgewiesen werden. Es zeigte sich nach einer Hemmung mit Puromycin über 6 Stunden ein relativer Anstieg der ermittelten CT-Werte auf 1,6, umgerechnet auf den Bezugswert (Abbildung 19). Das bedeutet, dass PEX19 Δ 2 vor der Translationshemmung in 1,6-fach höherer Kopienzahl exprimiert wurde als danach.

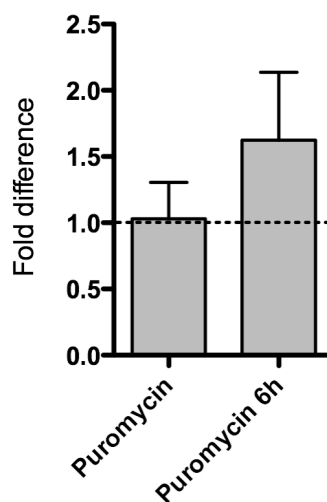


Abbildung 19 Relative Quantifizierung von PEX19 Δ 2 nach Translationshemmung mit Puromycin in humanen Fibroblasten durch relative Quantifizierung nach der Delta-Delta-Ct-Methode (Livak 2001).

3.2.2 Translationshemmung mit Cycloheximid

Zur Bestätigung der mit Puromycin als Hemmstoff erhaltenen Werte erfolgte eine erneute Durchführung des Versuchs mit Hemmung der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid (CHX) über eine, zwei und vier Stunden. Es zeigte sich nach einer Stunde ein Anstieg der Expression von PEX19 Δ 2 auf 1,4, nach zwei Stunden auf 1,6 und nach vier Stunden ein erneuter Rückgang auf 1,4 (Abbildung 20).

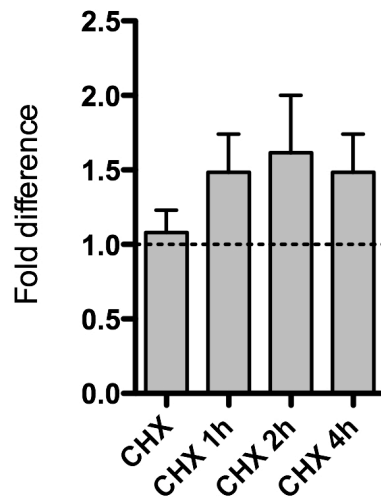


Abbildung 20 Relative Quantifizierung von *PEX19Δ2* nach Translationshemmung mit CHX in humanen Fibroblasten. Die Auswertung erfolgte entsprechend der Versuchsanordnung mit Puromycin jeweils nach einer, zwei und vier Stunden.

In einem weiteren Schritt haben wir das Verhältnis von *PEX19-all* zu *PEX19Δ2* nach Translationshemmung mit Cycloheximid untersucht. Hier zeigte sich eine deutliche relative Zunahme der Splicevariante, insbesondere nach einer Hemmung über zwei Stunden verringerte sich das ursprünglich deutlich zugunsten der Volllänge-Variante *PEX19-all* liegende Verhältnis auf 25%, was einer relativen Zunahme der Splicevariante *PEX19Δ2* um den Faktor 3 bezogen auf die Negativ-Probe und um den Faktor 2 bezogen auf die CHX-Nullprobe entsprach (Abbildung 21).

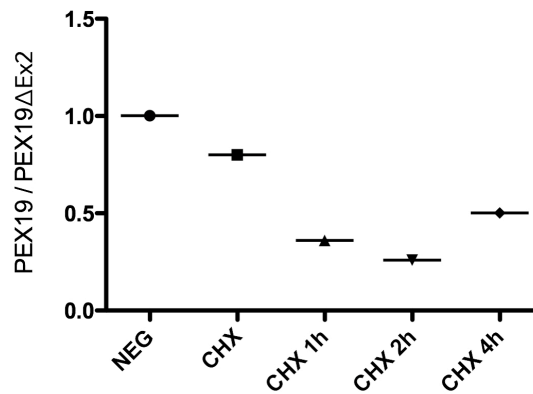


Abbildung 21 Darstellung des Faktors *PEX19-all/PEX19Δ2* nach Translationshemmung mit CHX. In dieser zweiten Auswertung des vorangegangenen Versuchs (siehe Abbildung 20) wird das Verhältnis von *PEX19-all* zu *PEX19Δ2* in Abhängigkeit der Dauer der Translationshemmung mit CHX angegeben. Der Bezugswert 1,0 beschreibt das Verhältnis der Splicevarianten vor der Translationshemmung.

In den Versuchen zur NMD-Hemmung konnte damit gezeigt werden, dass sich die Expression von *PEX19Δ2* durch Translationshemmung effektiv beeinflussen lässt. Sowohl in den Versuchen mit Puromycin als auch mit Cycloheximid konnte die Splicevariante in höherem Maße nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis konnte durch eine relative Quantifizierung des Verhältnisses *PEX19-all/PEX19Δ2* bestätigt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Splicevariante zumindest zu einem Teil, wenn auch nicht in hohem Maße, dem NMD unterliegt.

3.3 Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen von PEX19 und PEX19Δ2 mittels BRET

Die bekannte Funktion von PEX19 beschreibt seine Rolle als Targeting- und Transportprotein für peroxisomale Membranproteine zum Peroxisom (Fujiki 2006; Platta 2007). Um zu untersuchen, ob das Protein der Splicevariante *PEX19Δ2* ebenfalls peroxisomale Membranproteine bindet und somit voll oder zumindest teilweise funktionsfähig ist, wurde mittels Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer die Protein-Protein-Interaktion von PEX19 wie auch seiner Splicevariante *PEX19Δ2* und den bisher beschriebenen PEX19-Interaktionspartnern der peroxisomalen Membran (ABCD3, PEX16, PXMP4, PXMP2, SLC25A17, PEX12, PEX3, ABCD1, PEX14, PEX11B, PEX10, PXMP3, PEX13, PEX26, ABCD2, FIS1) in der lebenden Zelle untersucht. Hierzu

wurden PEX19 und die Splicevariante mit der codierenden DNA der jeweiligen Interaktionspartner jeweils am N- und am C-Terminus mit YFP oder Rluc getagged und somit in 8 möglichen Kombinationen kotransfiziert.

3.3.1 Interaktionen des Volllänge-PEX19-Proteins mit peroxisomalen Membranproteinen

Für PEX19 konnte eine Interaktion mit allen 16 getesteten PMP gezeigt werden (Abbildung 22), das heißt, mindestens eine aus acht getesteten Kombinationen zeigte eine BRET-Ratio über dem cutoff für eine positive Protein-Protein-Interaktion (PPI) von 0,094 für PEX19-kotransfiziert mit ABCD3 (BRET ratio 0,338), PEX16 (BRET ratio 0,388), PXMP4 (BRET ratio 0,296), PXMP2 (BRET ratio 0,251), SCL25A17 (BRET ratio 0,252), PEX12 (BRET ratio 0,109), PEX3 (BRET ratio 0,218), ABCD1 (BRET ratio 0,153), PEX14 (BRET ratio 0,179), PEX11B (BRET ratio 0,386), PEX10 (BRET ratio 0,115), PXMP3 (BRET ratio 0,136), PEX26 (BRET ratio 0,248), PEX13 (BRET ratio 0,093), ABCD2 (BRET ratio 0,441) und FIS1 (BRET ratio 0,141). Diese Ergebnisse bestätigen die bekannten Interaktionen zwischen PEX19 und seinen Interaktionspartnern. Eine BRET-Ratio leicht unter dem cutoff für eine positive PPI zeigte sich für die Interaktion zwischen PEX19 und PEX13 (BRET ratio 0,093).

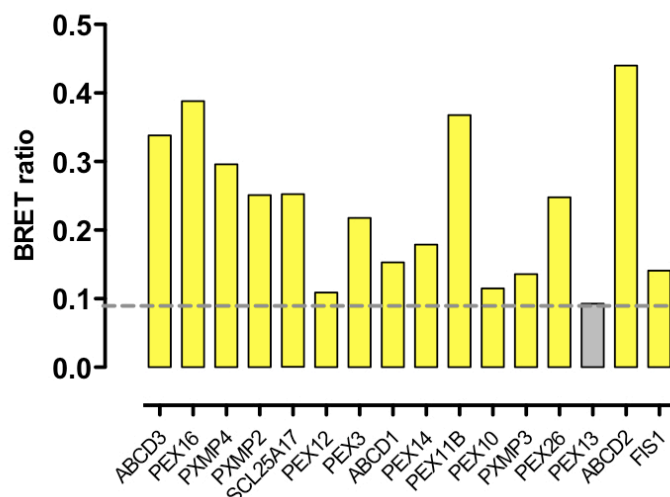


Abbildung 22 Protein-Protein-Interaktionen des Volllänge-PEX19-Proteins. Die in der Ordinate angegebene BRET-Ratio zeigt für 15 der 16 getesteten Interaktionspartnern von PEX19 eine Interaktion mit PEX19 (gelbe Säulen). Für PEX13 (graue Säule) lässt sich keine Interaktion mit PEX19 nachweisen, die BRET-Ratio liegt mit 0,093 knapp unter dem cutoff. Die grau gestrichelte Linie gibt den cutoff von 0,0943 an.

3.3.2 Interaktionen der Splicevariante PEX19 Δ 2 mit peroxisomalen Membranproteinen

PEX19 Δ 2 zeigte eine Interaktion mit 13 der 16 getesteten Interaktionspartnern. HEK293 kotransfiziert mit PEX19 Δ 2 und ABCD3 (BRET ratio 0,203), PEX16 (BRET ratio 0,140), PXMP4 (BRET ratio 0,235), PXMP2 (BRET ratio 0,184), SCL27A17 (BRET ratio 0,171), PEX12 (BRET ratio 0,136), PEX3 (BRET ratio 0,128), ABCD1 (BRET ratio 0,209), PEX11B (BRET ratio 0,238), PXMP3 (BRET ratio 0,268), PEX26 (BRET ratio 0,298), ABCD2 (BRET ratio 0,280) oder FIS1 (BRET ratio 0,140) zeigten jeweils eine BRET-Ratio über dem cutoff von 0,094 in einer aus acht untersuchten Tag-Kombinationen. Keine aus acht getesteten Tag-Kombinationen zeigte dagegen eine BRET-Ratio über dem cutoff für PEX19 mit PEX14 (BRET-Ratio 0,054), PEX19 mit PEX10 (BRET-Ratio 0,056) und PEX19 mit PEX13 (BRET-Ratio 0,002). Diese Ergebnisse zeigen ein distinktes Interaktionsmuster zwischen PEX19 und seiner Splicevariante, die nicht mit PEX14, PEX10 und PEX13 interagiert (Abbildung 23).

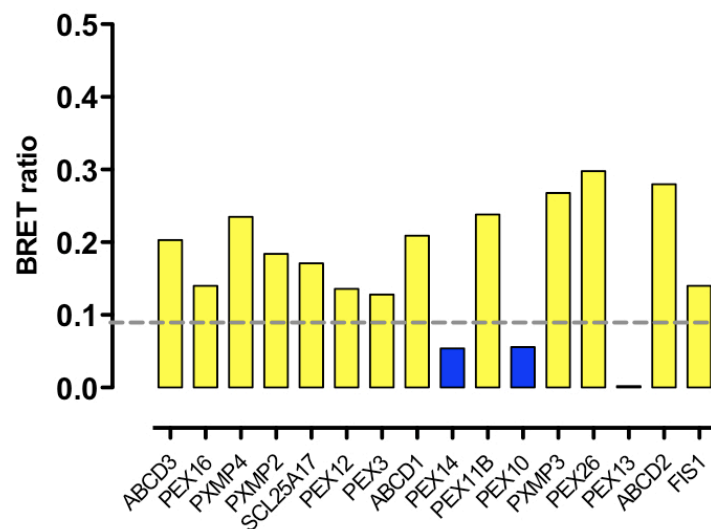


Abbildung 23 Protein-Protein-Interaktionen der Splicevariante. Die gelben Säulen zeigen eine positive Interaktion. Die dunkelblauen Säulen zeigen eine fehlende Interaktion von PEX19 Δ 2 mit PEX14, PEX10 und PEX13. Die gestrichelte Linie zeigt den cutoff von 0,094 an.

4 Diskussion

4.1 Quantifizierung der Splicevarianten

PEX19 ist ein für die peroxisomale Biogenese essentielles Protein. Bei einem genetischen Defekt von *PEX19* kommt es zu einer Störung der peroxisomalen Biogenese mit der schweren Form des Zellweger-Syndroms. Neben dem Volllänge-PEX19-Protein wurden in S. Kammerers Untersuchungen zur genomischen Organisation und molekularen Charakterisierung von *PEX19* drei Splicevarianten detektiert, darunter *PEX19Δ2*, die als mRNA signifikant in allen menschlichen Geweben vorkommt und *in vitro* für ein funktionsfähiges Protein kodiert, allerdings keine Komplementationsfunktion aufweist (Kammerer 1997; Kammerer 1998, Mayerhofer 2002). In vorliegender Arbeit wurde die Hypothese geprüft, ob die Splicevariante *PEX19Δ2* in menschlichem Uterus-Gewebe vermehrt exprimiert wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten die Hypothese, *PEX19Δ2* sei im Uterusgewebe eine in erhöhtem Maße vorkommende *PEX19*-Splicevariante, bestätigen. In den Messungen der *human first strand* cDNA ließen sich signifikant höhere Kopienzahlen als in Leber, Lunge, Hirn und Cervix nachweisen, in der Niere fanden sich dem Uterus entsprechende Kopienzahlen. Eine Umkehr der Verhältnisse von *PEX19-all* zu *PEX19Δ2* im Uterus konnte jedoch nicht gezeigt werden. Es konnten zudem signifikante quantitative Unterschiede von *PEX19-all* in Abhängigkeit vom Gewebe gezeigt werden, insbesondere in Uterus und Leber waren die Kopienzahlen höher als in den anderen Organen. Dies könnte auf einen vermehrten Bedarf an den durch Peroxisomen vermittelten Stoffwechselwegen sein. Für die Leber ist eine erhöhte Zahl und Größe von Peroxisomen bekannt. Erklärt wird dies durch die zentrale Rolle der Leber im Fettstoffwechsel, der Gallensäuresynthese, dem Ethanol-Abbau und weiteren Reaktionen, die zumindest teilweise in Peroxisomen ablaufen. Für welche spezifischen Funktionen im Uterus ein vermehrter Bedarf an Peroxisomen besteht, bedarf weiterer Untersuchungen. Möglich wäre eine Beteiligung an der Embryogenese, da hier nach Einnistung der Zygote durch die nun folgende Versorgung des Fetus eine Vielzahl neuer Stoffwechselfunktionen in der Uterusschleimhaut ablaufen. So wäre es denkbar, dass sich in allen Zyklusphasen erhöhte Expressionen peroxisomaler Proteine in den Uteruszellen finden lassen, welche jedoch durch den hohen Anteil der Splicevariante

nicht zu funktionellen Peroxisomen führen. Erst bei Bedarf kann dieser „Standby-Modus“ durch vermehrte Expression des Volllänge-PEX19-Proteins aufgehoben werden, was zur raschen Steigerung der de novo Synthese wie auch von Wachstum und Teilung der Peroxisomen führen würde.

Die Auswertung der cDNA, die im Rahmen dieser Arbeit aus menschlichen Gewebeproben nach mRNA-Isolierung gewonnen wurde, zeigte teilweise Diskrepanzen zu den Ergebnissen, die mit *human first strand* cDNA ermittelt wurden. Wieder konnte *PEX19-all* in allen Organen in hohen Kopienzahlen nachgewiesen werden, die vorbeschriebenen organspezifischen Schwankungen waren hier jedoch nicht signifikant. *PEX19Δ2* kam in deutlich niedrigeren Kopienzahlen vor als in der *human first strand* cDNA, wodurch das Verhältnis von *PEX19-all* zu *PEX19Δ2* hier stets zu Gunsten von *PEX19-all* verschoben war. Für den Uterus zeigte sich erneut ein hoher Anteil an *PEX19Δ2*.

Mögliche Ursache für den geringeren Anteil an *PEX19Δ2* bei den Untersuchungen mittels Real-Time RT-PCR könnte ein beschleunigter Abbau der Splicevariante sein. Die Zeit zwischen Todes-Zeitpunkt der Probandin und Entnahme der Probe konnte nicht exakt bestimmt werden, lag aber in jedem Fall im Bereich von mehreren Stunden. Die mRNA wird sehr schnell von ubiquitär vorkommenden RNAsen abgebaut, wobei Länge und Sequenz des Genabschnittes zu bevorzugtem, also schnellerem Abbau führen können, was die Ergebnisse beeinflussen kann. Die Länge von *PEX19-all* (3661 bp lineare RNA) und *PEX19Δ2* (3584 bp lineare RNA) ist weitgehend identisch, weshalb eine spezifische posttranskriptionale Regulierung, wie NMD, wahrscheinlich ist, da unspezifische Regulierungsmechanismen beide Varianten in gleichem Maße betreffen. Dafür sprechen zudem die Ergebnisse einzelner Probandinnen, die bei vergleichsweise niedrigen *PEX19-all*-Kopienzahlen durchschnittliche, also mit den anderen Probandinnen vergleichbare *PEX19Δ2*-Werte zeigten. Erklärt man das niedrige Level der *PEX19-all*-Kopienzahlen allein mit unspezifischem RNA-Abbau, wie er durch RNAsen vermittelt wird, so hätten sich auch erniedrigte *PEX19Δ2*-Kopienzahlen finden lassen müssen, da die beiden Varianten in Struktur und Länge zu ähnlich sind.

4.2 Regulierung durch NMD

Wir konnten zeigen, dass *PEX19Δ2* tatsächlich auf mRNA-Ebene in allen untersuchten Organen nachzuweisen ist, allerdings in geringerem Maße als die Volllänge-PEX-19-

Variante. Dies könnte unter anderem durch nonsense-mediated mRNA decay (NMD) der Splicevariante erklärt werden, da diese ein vorgezogenes Stop-Codon aufweist, das eine Regulierung durch NMD wahrscheinlich werden lässt. Es ist bekannt, dass durch NMD etwa ein gutes Drittel aller Splicevarianten reguliert werden (*Lewis 2003*), wobei man davon ausgeht, dass 95% der menschlichen Gene mit mehreren Exons alternativem Splicing unterliegen (*Pan Q et al 2008*) und dabei durchschnittlich etwa 3,5 verschiedene Varianten entstehen (*Kim H 2004*). Dies zeigt auch klar, dass alternatives Splicen die wichtigste Quelle für NMD-Substrate darstellt. Die Zelle reguliert demnach unter anderem die Genexpression mittels unproduktivem, alternativem Splicen, dem so genannten „regulated unproductive Splicing and Translation“ (RUST) (*Isken 2008; Mc Glinchy 2008*).

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass zahlreiche physiologische Transkripte ebenfalls einer Regulierung durch NMD unterliegen (*Alonso 2005*). Somit muss davon ausgegangen werden, dass NMD eine weitaus wichtigere Rolle in der posttranskriptionellen Regulierung einnimmt als bisher angenommen (*Frischmeyer 1999*). Zudem werden immer wieder Gene beschrieben, die ihrer molekularen Organisation nach NMD unterliegen müssten, jedoch in hoher Kopienzahl vorkommen (*Brocke 2002; Denecke 2004*). Die Ursache dafür konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden (*Silva 2009*).

Wir konnten zeigen, dass *PEX19Δ2* einer Regulierung durch NMD unterliegt. Die Ergebnisse belegen, dass eine effiziente NMD-Hemmung einen vermehrten Nachweis von *PEX19Δ2*-Splicevarianten zur Folge hatte. Dies spricht für eine NMD-abhängige Regulierung. Allerdings wohl nicht in vollem Ausmaß, wie auch die Tatsache zeigt, dass *PEX19Δ2* in der quantitativen Untersuchung der human first strand cDNA stets in hohen Kopienzahlen nachgewiesen werden konnte, so dass von einer stattfindenden Translation ausgegangen werden muss, wie durch die *in vitro*-Experimente zur Translationshemmung ebenfalls bestätigt werden konnte. Da in früheren Untersuchungen jedoch keine funktionelle Komplementation von *PEX19*-defizienten Fibroblasten durch *PEX19Δ2* nachgewiesen werden konnte (*Mayerhofer et al., 2002*) liegt nun die Vermutung nahe, dass *PEX19Δ2* einzelne Funktionen von *PEX19* in der Zelle mitträgt, bzw sogar weitere Funktionen hat, die durch alternatives Splicen und NMD reguliert werden.

4.3 Bestimmung der Protein-Protein-Interaktion mittels BRET

Die wichtigste Funktion von PEX19 ist die Bindung und der Transport von PMP zur peroxisomalen Membran. Um die Frage zu beantworten, ob auch die *PEX19Δ2*-Splicevariante PMP bindet bzw. sich hier ein Unterschied zu der Volllänge-PEX19-Variante zeigt, wurde mittels Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET) untersucht, ob die Splice-Variante im Vergleich zur Full-Length Variante ein unterschiedliches Interaktionsmuster zeigt. Werden nun im Vorfeld die jeweiligen Domänen von PEX19 und PEX19Δ2 betrachtet, so fällt auf, dass sich sowohl die Bindungsstelle für PEX14 wie auch die für PEX13 in Domäne D1 und teilweise in Domäne D2 befindet, die dem Protein der Splicevariante *PEX19Δ2* ganz oder zu großen Teilen fehlen, weshalb wir hier nicht von einer Interaktion ausgingen. Die Bindungsstellen der zahlreichen anderen untersuchten PMP liegen in der Domäne D3, welche weiterhin voll translatiert wird, weshalb hier ein Interaktion wahrscheinlicher schien.

Anhand dieser Untersuchung wurde bestätigt, dass PEX19 mit 16 bekannten peroxisomalen Membranproteinen interagiert und bei einer leicht unter dem Cutoff liegenden BRET ratio von 0,093 für PEX19-PEX13 zwar die Gefahr einer falsch positiven Interaktion steigt, aber dennoch von einer PPI ausgegangen werden kann. Das Protein der Splicevariante *PEX19Δ2* zeigt eine Interaktion mit ABCD3, PEX16, PXMP4, PXMP2, SCL25A17, PEX12, PEX3, ABCD1, PEX11B, PXMP3, PEX26, ABCD2, FIS1, kann hingegen nicht an PEX14, PEX13 und PEX10 binden. Da sich PEX13 und PEX 14 in Domäne D1 befinden, welche der Splicevariante *PEX19Δ2* fehlt, stimmen die von uns ermittelten Daten zur fehlenden Interaktion hier mit den nach den aktuellen Erkenntnissen zu erwartenden Ergebnissen überein.

PEX14 ist ein für den Import von Matrixproteinen in das Peroxisom essentielles Peroxin (Williams, 2005). Es wird durch PEX19 wie alle PMP der Klasse I im freien Zytosol gebunden (Itoh, 2006) und dann in die peroxisomale Membran eingebaut, wo es als wichtiger Teil das Docking-Komplexes mit PEX5 interagiert, welches seinerseits die Matrixproteine bindet und transportiert. Fehlt PEX14, so ist der Import peroxisomaler Matrixproteine gestört und es zeigt sich der Phänotyp des Zellwegerspektrums. Ist die Interaktion von PEX19 und PEX14 nun gestört, so liegt nahe, dass folglich kein Import von Matrixproteinen stattfinden kann, was erklären könnte, warum eine Transfektion mit *PEX19Δ2* nicht zur Komplementierung von Peroxisomen-defizienten Zellen führt.

Gleiches trifft für die fehlende Interaktion mit PEX10 zu, welches ebenfalls am Matriximport beteiligt ist. Die Splicevariante ist jedoch weiterhin in der Lage, mit den 13 anderen untersuchten PMP zu interagieren, wie für PEX3, ABCD1, ABCD2 und ABCD3 bereits von Mayerhofer gezeigt wurde. Somit trägt sie weiter einzelne Funktionen des Full-Length Proteins. Eine Interaktion zu den PMP der Klasse II (PEX3 und PEX16) konnte im Rahmen der Arbeit auch für die Splicevariante gezeigt werden, weshalb der Einbau gezielter peroxisomaler Membranproteine im Rahmen der peroxisomalen Biogenese theoretisch auch mit PEX19 Δ 2 stattfinden kann.

Bedenkt man nun, dass eine Regulierung der Splicevariante PEX19 Δ 2 durch NMD stattfindet, so bietet dies der Zelle die Möglichkeit, das Ausmaß der peroxisomalen Stoffwechselfunktionen durch deren Anzahl und Funktionalität den gegebenen Ansprüchen bereits zum Zeitpunkt der peroxisomalen Biogenese nach Bedarf NMD-vermittelt anzupassen. So ist bekannt, dass in Abhängigkeit der aktuellen Stoffwechsellage und des jeweiligen Organs Peroxisomen in Zahl und Größe stark variieren (Schrader, 2008).

4.4 Diskussion der Methoden

Aspekte zur Messung mit dem realtime Cyclor

Um das quantitative Verhältnis der Splicevariante PEX19 Δ 2 und der Volllänge-Variante PEX19 zu untersuchen, bietet sich die Etablierung einer Real-Time RT-PCR mit Standardkurve an, da hier im Gegensatz zur RT-PCR sehr gut genaue, quantitative mRNA-Messungen durchgeführt werden können (Vandenbroucke 2001). Dabei gilt es, diverse Voraussetzungen und Umsetzungsbedingungen zu beachten, um sie in die Interpretation der Ergebnisse mit einbeziehen zu können.

Da die Ergebnisse des Messgerätes über ein Softwareprogramm angezeigt werden, sind sie nach dem Versuch auf verschiedene Art und Weise zu betrachten, aber auch zu modifizieren. Als erstes muss beachtet werden, dass der Ct-Wert anhand eines Schwellenwertes errechnet wird, den das Softwareprogramm nach jeder Messung neu angibt und der automatisch der Effizienz des jeweiligen Versuches angepasst wird (Rutledge 2004). So gibt jedes der gleichzeitig untersuchten Versuchsgefäße, in denen sich ein 20 μ l Ansatz befindet, eine andere Grundfluoreszenz ab. Diese schwankt unabhängig von der Ausgangsmenge der Amplifikate und muss angeglichen werden, will man verschiedene Ansätze miteinander vergleichen (Jarionov 2005). Die Software

des Gerätes bietet einen „background subtracted“ Anzeigemodus an, der die Schwankungen ausgleicht. Werden jedoch, wie im Rahmen der absoluten Quantifizierung häufig geschehen, sehr viele unterschiedliche Proben mehrerer Ansätze ausgewertet, so sind die durch die Software errechneten Ct-Werte höher als bei der Auswertung weniger Proben eines einzelnen Ansatzes, wie im Rahmen der relativen Quantifizierung. Die Ursache für die falsch hohen Ct-Werte liegt unter anderem an Fluoreszenz-Schwankungen während der sehr späten Phase des Versuchs (über 35 Zyklen). Sie werden durch Primer-Dimere verursacht, die mit in die Auswertung einbezogen werden. Da die Gesamtintensität der Fluoreszenz erhöht ist, wird der errechnete Schwellenwert, an dem der Ct-Wert errechnet wird, ebenfalls erhöht. Dieser Messfehler wurde ausgeglichen, indem alle Reaktionsansätze über den gleichen, für alle Ansätze gültigen Schwellenwert abgelesen wurden. Dieser fiel in die Phase der exponentiellen Vermehrung, welche im Falle einer verminderten Ausgangskopienzahl verfrüht aufhört, da dann die Substrate zuvor verbraucht werden, Produktfragmente miteinander hybridisieren und die Taq-Polymerase wie auch die Nukleotide durch die Erhitzung zerstört werden.

Ist der zu untersuchende und quantitativ zu bestimmende mRNA-Abschnitt im Verhältnis zur Gesamt-RNA nur in geringer Menge vorhanden (z.B. eine seltene Splicevariante), so wird dieser Mengenunterschied durch den Transkriptions-Vorgang zusätzlich verstärkt, da die Oligo-T-Primer unverhältnismäßig seltener an diesen Einzelstrang binden und er somit auch in kleinerem Anteil in cDNA umgeschrieben wird. Einen ähnlichen Effekt kann man auch bei der Real-Time PCR beobachten. Hier spricht man vom „Monte Carlo Effect“ (Bustin 2000; 2002). Im Rahmen dieser Arbeit konnte *PEX19Δ2* in den meisten Organen in ausreichend hoher Menge nachgewiesen werden, so dass man nur in den wenigen Organproben mit auffällig niedrigen *PEX19Δ2*-Kopienzahlen von einer relevanten Verzerrung des Ergebnisses durch diesen Effekt ausgehen muss.

GAPDH bildet im Rahmen dieser Arbeit das geeignete housekeeping gene als internen Standard für die Auswertung der relativen Quantifizierung nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Bas 2004) (Huggett 2005). Einige Autoren halten die Umrechnung auf die gesamte mRNA einer Gewebeprobe mittels solcher Gene für selbstverständlich und unproblematisch. Andere Arbeiten weisen ausdrücklich auf starke Schwankungen der „Standards“, abhängig von der untersuchten Gewebeart hin (Tricarico 2002), was in dieser Arbeit

kein Problem darstellte, da ausschließlich mRNA aus Fibroblasten für die Auswertungen verwendet wurde. Es werden jedoch Expressionunterschiede des housekeeping-Gens im Rahmen bewusst beeinflusster Stoffwechselvorgänge, in Abhängigkeit der Zellkulturparameter und des jeweiligen Zellzyklus beschrieben (Thellin 1999). Da die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fibroblasten im gleichen Medium und unter gleichen Bedingungen gezogen wurden und zum gleichen Zeitpunkt ausgewertet wurden, konnte dieses Problem umgangen werden.

Aspekte zur Detektion der BRET-Signale

Die BRET-Methode bietet im Gegensatz zum klassischen Hefe-Zwei-Hybrid-System die Möglichkeit, Interaktionsmessungen in der lebenden, menschlichen Zelle in Echtzeit durchzuführen und eignet sich zudem sowohl zur Untersuchung von Matrixproteinen als auch insbesondere von Membranproteinen verschiedener Zellorganellen, was die Methode zur Untersuchung der PEX19-Interaktionen in besonderem Maße geeignet erscheinen lässt (Hamdan 2006; Mercier 2002).

Die Effizienz des Energietransfers des BRET-Ansatzes hängt von der genauen Ausrichtung und des Abstandes des Donors und des Akzeptors ab. So können zwei untersuchte Proteine durchaus interagieren, ohne dass ein BRET-Signal detektiert wird, wenn der Donor oder der Akzeptor in einer ungünstigen Konstellation zueinander stehen, die den Energie-Transfer behindert. Dies tritt insbesondere dann auf, wenn es sich um große Proteine handelt, welche an einer umschriebenen Sequenz so miteinander reagieren, dass Donor und Akzeptor weiterhin zu weit auseinander liegen. Es ist daher wichtig, die Proteinpaare stets an den unterschiedlichen Enden (also dem N- und dem C-Terminus) mit jeweils dem Donor und dem Akzeptor, also jeweils in acht Kombinationen, miteinander zu fusionieren. Außerdem kann es durch die Fusionierung zu behindernden räumlichen Änderungen des untersuchten Proteins kommen oder selten auch zu Änderungen der physiologischen Funktion. Demnach sollten bei ausbleibendem BRET-Signal weitere Versuchsanordnungen durchgeführt werden um das negative Ergebnis zu bestätigen. Andererseits bedeutet ein besonders starkes BRET-Signal nicht zwangsläufig, dass das Proteinpaar in besonders hohem Maße im Sinne einer stärkeren Affinität oder höheren Anzahl an Komplexen miteinander interagiert sondern kann lediglich ein Hinweis darauf sein, dass der Abstand zwischen Donor und Akzeptor innerhalb des Proteinkomplexes nach Interaktion besonders gering ist.

Durch die zufällige Koloalisation zweier nicht miteinander interagierender Proteine kann es zu unspezifischen BRET-Signalen kommen („bystander BRET“), welche von den spezifischen Signalen abgegrenzt werden müssen. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit durch den validierten Cut-Off für die BRET-ratio (0,094) erreicht.

Eine weitere mögliche Einschränkung bei der Auswertung der BRET-Untersuchungen ist die Tatsache, dass sich die Methode auf die Darstellung von dimeren Interaktionen beschränkt und somit mögliche polymere Interaktionen nicht abgegrenzt werden können und überdies die Messung beeinflussen können (*Hamdan, 2006*). Wir konnten eine Protein-Interaktion von PEX19 mit 16 Interaktionspartnern in getrennten Ansätzen jeweils nachweisen, weshalb eine mögliche polymere Interaktion mit mehreren der Interaktionspartnern nicht zu einer Verfälschung des Ergebnis führt.

Da die Substrate der BRET-Untersuchung die Zellmembranen durchdringen können, lassen sich Protein-Interaktionen unabhängig von den Zellkompartimenten und Organellen, in denen sie stattfinden darstellen. Eine Lokalisierung ist jedoch nicht möglich. Aufgrund der geringen Lichtmenge, die durch die BRET-Reaktion emittiert wird ist eine Darstellung unter dem Mikroskop, wie bei Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET), zur Lokalisierung derzeit noch nicht mit ausreichender Sensitivität möglich (*Hamdan, 2006*). Die Interaktionen von PEX19 finden bekanntermaßen sowohl im freien Zytosol als auch an der peroxisomalen Membran statt wobei der jeweilige Interaktionsort mit den jeweiligen Interaktionspartnern im Einzelnen noch nicht genau beschrieben ist.

5 Zusammenfassung

Das peroxisomale Protein PEX19 ist an wesentlichen Schritten der frühen Biogenese beteiligt und für die Entstehung der peroxisomalen Biomembran essentiell. Bei einem Defekt des *PEX19*-Gens kommt es zum Zellweger Syndrom, dem bekanntesten und im Verlauf schwersten Vertreter der klinischen Krankheitsbilder, die durch Störungen der peroxisomalen Biogenese und des peroxisomalen Stoffwechsels verursacht werden. Da diese immer noch nicht therapiert werden können, ist eine genaue Erforschung und ein besseres Verständnis von *PEX19* von wesentlicher Bedeutung.

Die genomische Organisation und die molekulare Charakterisierung des Gens wurden durch S. Kammerer durchgeführt. Dabei fiel ein relevantes Vorkommen der Splicevariante *PEX19Δ2* auf, welche *in vitro* translatiert wird, aber *PEX19*-defiziente Zellen nicht komplementieren kann.

Mittels quantitativer Real-Time PCR konnten wir zeigen, dass *PEX19Δ2* neben *PEX19-all* in allen untersuchten Geweben nachzuweisen war. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede in der absoluten Kopienzahl sowohl der Splicevariante wie auch der Full-Length Variante in Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe mit einem höchsten absoluten Anteil der Splicevariante in Uterus und Niere und einem höchsten relativen Anteil in Niere und Lunge.

Wir konnten zudem zeigen, dass *PEX19Δ2* dem nonsense-mediated mRNA decay (NMD) unterliegt. Dies ist vermutlich auf das vorgezogene Stop-Codon zurückzuführen, welches die Splicevariante aufweist. Allerdings ist der NMD im Falle von *PEX19Δ2* nicht vollständig, was erklärt, dass die Splicevariante sowohl in allen untersuchten Geweben nachzuweisen war, als auch *in vitro* translatiert wird.

Die essentielle Funktion von PEX19 ist der Transport von peroxisomalen Membranproteinen (PMP) durch direkte Interaktion mit diesen. Obwohl der Splicevariante *PEX19Δ2* in den Komplementationsversuchen keine volle Funktionsfähigkeit nachgewiesen werden konnte, stellt sich aufgrund der hohen mRNA-Kopienzahlen in den untersuchten Geweben, dem unvollständigen NMD und der bekannten *in vitro* Translation die Frage, ob nicht doch Interaktionen mit PMP bestehen, die auf eine besondere Rolle von *PEX19Δ2* schließen lässt. Daher wurde das Interaktionsmuster beider Varianten mittels Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET) untersucht. Es konnte dabei gezeigt werden, dass PEX19 mit allen 16

untersuchten Membranproteinen interagiert, wie es in der Literatur vorbeschrieben ist. *PEX19Δ2* zeigt ein distinktes Interaktionsmuster: Es interagiert nicht mit *PEX14*, dem Docking-Peroxin, das als Teil des Kargo-Translokon-Komplexes des Importomer-Komplexes eine essentielle Rolle beim Import peroxisomaler Matrixproteine spielt. Außerdem interagiert es nicht mit *PEX10* und *PEX13*, beides ebenfalls Peroxine des Importomer-Komplexes. Dies könnte erklären, warum *PEX19*-defiziente Zellen durch die Splicevariante nicht komplementiert werden können.

PEX19Δ2 kommt als mRNA in signifikanten Mengen vor, unterliegt inkomplett dem NMD, zeigt jedoch ein eingeschränktes Interaktionsmuster mit den PMP, was zu der Hypothese führt, dass durch die Splicevariante Funktionen in der peroxisomalen Biogenese übernommen werden, welche durch NMD reguliert werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

A

A Adenin

B

bp Basenpaare

BRET Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer

C

C Cytosin

cDNA komplementäre DNA

CHX Cycloheximide

COS7 Cv-1 (Nierenzellen der grünen Meerkatze) in **Origin**, carrying **SV40**

Ct Threshold

D

Δ delta

DNA Desoxyribonukleinsäure

E

E Exon

E. coli *Escherichia coli*

EDTA Ethylendiaminotetraacetat

EJC Exon Junktion Complex

ER Endoplasmatisches Retikulum

EtOH Ethanol

F

for forward

G

G Guanin

g Druck in bar

GAPDH Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase

K

kDA Kilodalton

M

M molar

μ g Mikrogramm

min Minute

ml Milliliter

μ l Mikroliter

μ m Mikrometer

mm³ Kubikmillimeter

mRNA messenger-RNA

N

NaCl Natriumchlorid
 NALD Neonatale Adrenoleukodystrophie
 NaOH Natriumhydroxid
 nm Nanometer
 NMD Nonsense mediated RNA decay

P

PBS Phosphate-Buffered-Saline
 PCR Polymerasekettenreaktion
 PEX Peroxin
 Pex Peroxin der Hefezelle
PEX peroxisomales Gen
 PMP peroxisomale Membranproteine
 PTC Premature Termination Codon
 PTS peroxisomal targeting signals

R

rev reverse
 RNA Ribonukleinsäure
 rpm Umdrehungen pro Minute ("Round per minute")
 rRNA Ribosomale RNA
 RT-PCR Reverse-Transkriptions-PCR

S

S Schwefel
 sek Sekunde
 std Stunde

T

T Thymin
 Taq *Thermus aquaticus*
 TBS Tris Buffered Saline

W

wt Wildtyp

X

X-ALD X-linked Adrenoleukodystrophie

Z

ZS Zellweger Syndrom

7 Literaturverzeichnis

- Agrawal, G., Subramani S. (2013). „Emerging role of the endoplasmic reticulum in the peroxisome biogenesis.“ *Frontiers in Physiology* Oct 8;4:286.
- Albertini, M., P. Rehling, et al. (1997). "Pex14p, a peroxisomal membrane protein binding both receptors of the two PTS-dependent import pathways." *Cell* 89(1): 83-92.
- Alonso, C. (2005). „Nonsense-mediated RNA decay: a molecular system micromanaging individual gene activities and suppressing genomic noise.“ *BioEssays* 27:463–466
- Applegarth, D. A., J. R. Toone, et al. (2000). "Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996." *Pediatrics* 105(1): e10.
- Aubourg, P., J. Scotto, et al. (1986). "Neonatal adrenoleukodystrophy." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 49(1): 77-86.
- Aubourg, P., O. Robain, et al. (1985). "The cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome: lamellar lipid profiles in adrenocortical, hepatic mesenchymal, astrocyte cells and increased levels of very long chain fatty acids and phytanic acid in the plasma." *J Neurol Sci* 69(1-2): 9-25.
- A. Bas, G. Forsberg, et al. (2004). „Utility of the Housekeeping Genes 18S rRNA, b-Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase for Normalization in Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Human T Lymphocytes.“ *Scandinavian Journal of Immunology* 59, 566–573
- Bezman, L., A. B. Moser, et al. (2001). "Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening." *Ann Neurol* 49(4): 512-7.
- Bowen, P., C. S. Lee, et al. (1964). "A Familial Syndrome of Multiple Congenital Defects." *Bull Johns Hopkins Hosp* 114: 402-14.
- Braun P, Tasan M, Dreze M et al (2009) An experimentally derived confidence score for binary protein-protein interactions. *Nat Methods* 6:91-97
- Brett, D., J. Hanke, et al. (2000). "EST comparison indicates 38% of human mRNAs contain possible alternative splice forms." *FEBS Lett* 474(1): 83-6.
- Brocke K., Neu-Yilik G. et al (2002). „The human intronless melanocortin 4-receptor gene is NMD insensitive.“ *Human Molecular Genetics*, 2002, Vol. 11, No. 3, 331 – 335.
- Brul, S., A. Westerveld, et al. (1988). "Genetic heterogeneity in the cerebrohepatorenal (Zellweger) syndrome and other inherited disorders with a generalized impairment of peroxisomal functions. A study using complementation analysis." *J Clin Invest* 81(6): 1710-5.
- Bustin S.A. (2000). „Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.“ *Journal of Molecular Endocrinology* 25, 169–193

- Bustin S.A. (2002). „Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems.“ *Journal of Molecular Endocrinology* 29, 23–39
- Chang, C. C., D. S. Warren, et al. (1999). "PEX12 interacts with PEX5 and PEX10 and acts downstream of receptor docking in peroxisomal matrix protein import." *J Cell Biol* 147(4): 761-74.
- Changle M., Suresh S. (2009). „Peroxisome Matrix and Membrane Protein Biogenesis.“ *IUBMB life* 61(7): 713-722
- De Duve, C. (1996). "The birth of complex cells." *Sci Am* 274(4): 50-7.
- De Duve, C. and P. Baudhuin (1966). "Peroxisomes (microbodies and related particles)." *Physiol Rev* 46(2): 323-57.
- Delille HK, Schrader M. (2008) „Targeting of hFis1 to peroxisomes is mediated by Pex19p.“ *J Biol Chem.* 283(45):31107-15.
- Denecke J., Kranz C., et al. (2004) „An Activated 50 Cryptic Splice Site in the Human ALG3 Gene Generates a Premature Termination Codon Insensitive to Nonsense-Mediated mRNA Decay in a New Case of Congenital Disorder of Glycosylation Type Id (CDG-Id).“ *HUMAN MUTATION* 23: 477 - 486
- Ebberink MS, Mooijer PA, Gootjes J, Koster J, Wanders RJ, Waterham HR (2011). „Genetic classification and mutational spectrum of more than 600 patients with a Zellweger syndrome spectrum disorder.“ *Hum Mutat* 32 (1): 59-69
- Erdmann, R. and G. Blobel (1996). "Identification of Pex13p a peroxisomal membrane receptor for the PTS1 recognition factor." *J Cell Biol* 135(1): 111-21.
- Fransen, M., Wylin, T., et al (2001). „Human Pex19p binds peroxisomal integral membrane proteins at regions distinct from their sorting sequences.“ *Moll. Cell. Biol.* 21, 4413 – 4424.
- Fransen, M., I. Vastiau, et al. (2004). "Potential role for Pex19p in assembly of PTS-receptor docking complexes." *J Biol Chem* 279(13): 12615-24.
- Fransen, M., I. Vastiau, et al. (2005). „Analysis of Human Pex19p's Domain Structure by Pentapeptide Scanning Mutagenesis“. *J. Mol. Biol* 346, 1275 – 1286.
- Frischmeyer, P., Dietz H. (1999). „Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease.“ *Human Molecular Genetics*, 1999, Vol. 8, No 10 Review, 1893 – 1900.
- Fujiki Y, Matsuzono Y, Matsuzaki T, Fransen M (2006) „Import of peroxisomal membrane proteins: the interplay of Pex3p- and Pex19p-mediated interactions.“ *Biochim Biophys Acta* 1763:1639–1646
- Fujiki Y, Yagita Y, Matsuzaki T (2012). „Peroxisome biogenesis disorders: Molecular basis for impaired peroxisomal membrane assembly: In metabolic functions and biogenesis of peroxisomes in health and disease.“ *Biochim Biophys Acta.* 2012 Sep;1822(9):1337-42
- Gersting SW, Lotz-Havla AS, Muntau AC (2012) „Bioluminescence resonance energy transfer: An emerging tool for the detection of protein-protein interaction in living cells.“ *Methods Mol Biol.* 2012; 815:253-63

- Green, R. E., B. P. Lewis, et al. (2003). "Widespread predicted nonsense-mediated mRNA decay of alternatively-spliced transcripts of human normal and disease genes." *Bioinformatics* 19 Suppl 1: i118-21.
- Gresch O, Engel FB, Nesic D et al (2004) "New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods*" 33:151-163
- Hamdan FF, Percherancier Y, Breton B, Bouvier M (2006). „Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET).“ *Curr Protoc Neurosci*. Chapter 5:Unit 5.23.
- Hamm A, Krott N, Breibach I et al (2002) Efficient transfection method for primary cells. *Tissue Eng* 8:235-245
- Heiland, I. and R. Erdmann (2005). "Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins." *Febs J* 272(10): 2362-72.
- Hilman, R., Green, R., Brenner S. (2004). „An unappreciated role for RNA surveillance“. *Genome Biology* 2004, 5:R8
- Hoepfner, D., D. Schildknecht, et al. (2005). "Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation." *Cell* 122(1): 85-95.
- Holbrook, J.A., Neu-Yilik, G., Hentze, A.E. and Kulozik, M.W. (2004) „Nonsensemediated decay approaches the clinic.“ *Nat. Genet.* 36, 801–808.
- J Huggett, K Dhed, et al. (2005). „Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations.“ *Genes and Immunity* 6, 279–284
- Ishigaki, Y., X. Li, et al. (2001). "Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20." *Cell* 106(5): 607-17.
- Isken O, Maquat LE (2008) „The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation.“ *Nat Rev Genet* 9:699–712
- Itoh, R, Fuliki, Y (2006) „Functional Domains and Dynamic Assembly of the Peroxin Pex14p, the Entry Site of Matrix Proteins.“ *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 281, No. 15, pp. 10196–10205
- Jones JM, Morrell JC, Gould SJ (2004) „PEX 19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins.“ *Cell Biol* 164:57-67
- Jourdain I, Sontam D, Johnson C, Dillies C, Hyams JS (2008) Dynamin-dependent biogenesis, cell cycle regulation and mitochondrial association of peroxisomes in *Wssion* yeast. *TraYc* 9:353–365
- Kammerer, S., N. Arnold, et al. (1997). "Genomic organization and molecular characterization of a gene encoding HsPXF, a human peroxisomal farnesylated protein." *Genomics* 45(1): 200-10.
- Kelley, R. I., N. S. Datta, et al. (1986). "Neonatal adrenoleukodystrophy: new cases, biochemical studies, and differentiation from Zellweger and related peroxisomal polydystrophy syndromes." *Am J Med Genet* 23(4): 869-901.

- Kim H, Klein R, Majewski J, Ott J (2004) „Estimating rates of alternative splicing in mammals and invertebrates.“ *Nat Genet* 36:915–916; author reply 916–917
- Kim PK, Mullen RT, Schumann U, Lippincott-Schwartz J. (2006): “The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16- dependent pathway from the ER.” *J. Cell Biol*;173:521–532.
- Kunau, W. H. (2005). "Peroxisome biogenesis: end of the debate." *Curr Biol* 15(18): R774-6.
- Lamba, J. K., M. Adachi, et al. (2003). "Nonsense mediated decay downregulates conserved alternatively spliced ABCC4 transcripts bearing nonsense codons." *Hum Mol Genet* 12(2): 99-109.
- Larionov, A., Krause, A., Miller, W. (2005). „A standard curve based method for relative real time PCR dataprocessing.“ *BMC Bioinformatics* 2005, 6:62 doi:10.1186/1471-2105-6-62
- Lazarow, P. B. (2003). "Peroxisome biogenesis: advances and conundrums." *Curr Opin Cell Biol* 15(4): 489-97.
- Lazarow, P. B. and Y. Fujiki (1985). "Biogenesis of peroxisomes." *Annu Rev Cell Biol* 1: 489-530.
- Le Hir, H., D. Gatfield, et al. (2001). "The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay." *Embo J* 20(17): 4987-97.
- Lewis, B. P., R. E. Green, et al. (2003). "Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1): 189-92.
- Livak, K.J., Schmittgen, T. (2001). „Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Method.“ *METHODS* 25, 402–408 doi:10.1006/meth.2001.1262
- Losson R, Lacroute F (1979) Interference of nonsense mutations with eukaryotic messenger RNA stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:5134–5137
- Luers GH, Thiele S, Schad A, Volkl A, Yokota S, Seitz J (2006) Peroxisomes are present in murine spermatogonia and disappear during the course of spermatogenesis. *Histochem Cell Biol* 125:693–703
- Lykke-Andersen, J., M. D. Shu, et al. (2000). "Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon." *Cell* 103(7): 1121-31.
- Maquat LE, Kinniburgh AJ, Rachmilewitz EA, Ross J (1981) „Unstable beta-globin mRNA in mRNA-deficient beta o thalassemia.“ *Cell* 27:543–553
- Mayerhofer P. U., Kattenfeld T. et al. (2002) „Two Splice Variants of Human *PEX19* Exhibit Distinct Functions in Peroxisomal Assembly.“ *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291, 1180–1186

- McGlinchey NJ, Smith CW (2008) „Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense?“ *Trends Biochem Sci* 33:385– 393
- Mercier J-F, Salahpour A, Angers S, Breit A, Bouvier M (2002) „Quantitative Assessment of β 1- and β 2-Adrenergic Receptor. Homo- and Heterodimerization by Bioluminescence Resonance Energy Transfer.“ *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol 277, pp 44925 – 44931.
- Motley AM, Hettema EH (2007)“ Yeast peroxisomes multiply by growth and division.“ *J Cell Biol* 178:399–410
- Muntau, A. C., A. A. Roscher, et al. (2003). "Interaction of PEX3 and PEX19 visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET)." *Adv Exp Med Biol* 544: 221-4.
- Muntau, A. C., A. A. Roscher, et al. (2003). "The interaction between human PEX3 and PEX19 characterized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis." *Eur J Cell Biol* 82(7): 333-42.
- Muntau, A. C., A. Holzinger, et al. (2000). "The human PEX3 gene encoding a peroxisomal assembly protein: genomic organization, positional mapping, and mutation analysis in candidate phenotypes." *Biochem Biophys Res Commun* 268(3): 704-10.
- Matsuzaki T, Fujiki Y.(2008). „The peroxisomal membrane protein import receptor Pex3p is directly transported to peroxisomes by a novel Pex19p- and Pex16p-dependent pathway“. *J Cell Biol*. 183(7):1275-86.
- Nagy, E. and L. E. Maquat (1998). "A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance." *Trends Biochem Sci* 23(6): 198-9.
- Neu-Yilik, G., N. H. Gehring, et al. (2004). "Nonsense-mediated mRNA decay: from vacuum cleaner to Swiss army knife." *Genome Biol* 5(4): 218.
- Nicholson, P., Hasmik Yepiskoposyan et al (2009) „Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors“ *Cell. Mol. Life Sci*. 67 :677–700
- Nilsen TW, Graveley BR (2010). Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463:457–463.
- Olsen, L. J. (1998). "The surprising complexity of peroxisome biogenesis." *Plant Mol Biol* 38(1-2): 163-89.
- Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ (2008) „Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing.“ *Nat Genet* 40:1413–1415
- Pfleger, K.D., Eidne, K.A. (2006) „Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET).“ *Nat. Methods* 3, 165-174
- Platta W. and R. Erdmann (2007). „Peroxisomal dynamics“. *TRENDS in Cell Biology*, Vol. 17, No. 10: 474-484

- Purdue, P. E. and P. B. Lazarow (2001). "Peroxisome biogenesis." *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 701-52.
- Rucktäschel R, Thoms S et al (2009). „Farnesylation of pex19p is required for its structural integrity and function in peroxisome biogenesis.“ *J Biol Chem* 284(31):20885-96
- Rutledge, R.G. (2004). „Sigmoidal curve-fitting redefines quantitative real-time PCR with the prospective of developing automated high-throughput applications.“ *Nucleic Acids Research*, 2004, Vol. 32, No. 22
- Sacksteder KA, Jones JM, South ST, Li X, Gould SJ (2000). „PEX19 binds multiple peroxisomal membrane proteins, is predominantly cytoplasmic, and is required for peroxisome membrane synthesis.“ *J Cell Biol* 148:931-944
- Sanger F. et al. (1977). „Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA.“ *Nature*. Bd. 265, S. 687–695
- Santos, M. J., T. Imanaka, et al. (1988). "Peroxisomal membrane ghosts in Zellweger syndrome--aberrant organelle assembly." *Science* 239(4847): 1536-8.
- Schliebs, W., J. Saidowsky, et al. (1999). "Recombinant human peroxisomal targeting signal receptor PEX5. Structural basis for interaction of PEX5 with PEX14." *J Biol Chem* 274(9): 5666-73.
- Schrader M., Fahimi H.D. (2008). „The peroxisome: still a mysterious organelle.“ *Histochem Cell Biol*. 129(4):421-40.
- Schutgens, R. B., H. S. Heymans, et al. (1984). "Diagnosis of Zellweger's cerebrohepatorenal syndrome." *Tijdschr Kindergeneesk* 52(6): 231-8.
- Snyder, W. B., K. N. Faber, et al. (1999). "Pex19p interacts with Pex3p and Pex10p and is essential for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*." *Mol Biol Cell* 10(6): 1745-61.
- Snyder, W. B., Koller A., Choy A.J., Subramani S. (2000). " The peroxin Pex19p interacts with multiple, integral membrane proteins at the peroxisome membrane." *J Cell Biol* 149:1171-1178.
- Stalder L, Muhlemann O (2008) „The meaning of nonsense.“ *Trends Cell Biol* 18:315–321
- Steven J Steinberg, Gerald V Raymond (2003) „Peroxisome biogenesis disorders, Zellweger syndrome spectrum“ *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2013
- Silva ,A.L., Romao, L. (2009). “The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway: To decay or not to decay! Which players make the decision?” *FEBS Lett*. 583(3):499-505
- Subramani, S., A. Koller, et al. (2000). "Import of peroxisomal matrix and membrane proteins." *Annu Rev Biochem* 69: 399-418.
- Sureau, A., R. Gattoni, et al. (2001). "SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs." *Embo J* 20(7): 1785-96.

- Tabak, H. F., J. L. Murk, et al. (2003). "Peroxisomes start their life in the endoplasmic reticulum." *Traffic* 4(8): 512-8.
- O. Thellin, W. Zorzi, et al. (1999). „Housekeeping genes as internal standards: use and limits.“ *Journal of Biotechnology* 75 (1999) 291–295
- Thoms, S. and R. Erdmann (2006). "Peroxisomal matrix protein receptor ubiquitination and recycling." *Biochim Biophys Acta* 1763(12): 1620-8.
- Titorenko VI, Mullen RT (2006). „Peroxisome biogenesis: the peroxisomal endomembrane system and the role of the ER.“ *J. Cell Biol* 174:11–17.
- Theodoulou FL, Bernhardt K et al (2013). „Peroxisome membrane proteins: multiple trafficking routes and multiple functions?“ *Biochem J.* 2013 May 1; 451(3): 345-52.
- Tricarico C, Pinzani P, et al. (2002). „Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies.“ *Anal Biochem.* 2002 Oct 15;309(2):293-300.
- Van Ael E, Fransen M (2006) „Targeting signals in peroxisomal membrane proteins.“ *Biochim Biophys Acta* 1763:1629–1638
- Vandenbroucke I., Vandesompele J. (2001). „Quantification of splice variants using real-time PCR“ *Nucleic Acids Research* Vol. 29, No 13.
- Wanders, R. J. (2004). "Metabolic and molecular basis of peroxisomal disorders: a review." *Am J Med Genet A* 126(4): 355-75.
- Wanders, R. J. (2004). "Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders." *Mol Genet Metab* 83(1-2): 16-27.
- Williams, C. et al (2005). „*Saccharomyces cerevisiae* Pex14p contains two independent Pex5p binding sites which are both essential for PTS1 protein import.“ *FEBS Lett.* 579, 3416 – 3420.
- Wollerton, M. C., C. Gooding, et al. (2004). "Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay." *Mol Cell* 13(1): 91-100.
- Wu, P. And Brand, L. (1994) „Resonance energy transfer: methods and applications.“ *Anal Biochem.* 218, 1-13
- Yagita Y, Hiromasa T, Fujiki Y. (2013). „Tail-anchored PEX26 targets peroxisomes via a PEX19-dependent and TRC40-independent class I pathway“ *J. cell Biol.* Vol. 200 No. 5 651-666
- Zheng S., Black D.L. (2013) „Alternative pre-mRNA splicing in neurons: Growing up and extending its reach.“ *Trends Genet.* 2013 Aug; 29(8): 442-8.

8 Danksagung

Ich möchte an erster Stelle meiner Doktormutter Frau Prof. Ania Muntau danken, die mir das Vertrauen schenkte, diese Dissertation zu schreiben. Ihr habe ich die einmalige Möglichkeit zu verdanken, wissenschaftliche Forschung zu betreiben und diese in Form dieser Arbeit auch nach meinem Berufseinstieg zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen.

Meinem Betreuer Dr. Peter Mayerhofer danke ich besonders für die Grundausbildung im Labor. Mit unvergleichlicher Geduld und Genauigkeit hat er mich in der Durchführung, Auswertung und Planung der zahlreichen Untersuchungen angeleitet.

Mein innigster Dank gilt dir, Amelie, ohne dich wäre eine Fertigstellung der Dissertation niemals möglich gewesen und ohne deinen steten Einsatz, deine einmaligen Fähigkeiten und deine Korrektur- und Verbesserungsvorschläge wäre aus mir nie der Autor einer Dissertation geworden.

Außerdem möchte ich dem Kubus-Team danken, Herrn Dr. Søren Gersting für die Hilfe und Planung der Fertigstellung, als es schon nicht mehr danach aussah, Herrn Prof. Dominik Hartl für die zahlreichen praktischen Ratschläge zur Labortätigkeit, den MTAs im Labor für Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit und allen Mit-Doktoranden nicht nur für ihre selbstverständliche Unterstützung sondern auch für die schöne Zeit, die ich mit euch verbringen durfte.

Ich bedanke mich sehr bei Frau Dr. Katja Anslinger und bei Herrn Dr. Hendrik Rosewich für die unkomplizierte Hilfe, die mir beide so prompt haben zukommen lassen.

Meine Frau Jovana hat es geschafft, mich immer wieder zur Arbeit an dieser Dissertation zu bewegen und war durch unsere gemeinsame Arbeitsplanung wesentlich am Gelingen beteiligt. Ebenso war das Software Know-how meines Bruders Jonas, das sich im Laufe der Zeit über zwei Betriebssysteme und drei Textverarbeitungsprogramme erstreckte für die Fertigstellung essentiell. Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken für ihr vorsichtiges bis zuweilen mahnendes Fragen nach dem Stand der Arbeit und meinem Großvater, der wie kaum jemand Interesse daran hatte, auch in seinem letzten Lebensabschnitt die Grundlagen der Molekularbiologie zu verstehen.

Eidesstattliche Versicherung

Von Beckerath, Clemens

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

**„Regulation, Funktion und Interaktionsmuster der Splicevariante
PEX19 Δ 2: Komplexe Regulierungsmechanismen der frühen peroxisomalen
Biogenese“**

Selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiterer Hilfsmittel bedient
und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind,
als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der
Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand